

Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf Wachstums- und
Stoffwechselprozesse bei Mikroalgen aus der Abteilung Chlorophyta

Kumulative Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau M.Sc. Claudia Scharff

Geb. am 30.06.84 in Karl-Marx-Stadt jetzt Chemnitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wulf Diepenbrock
2. Gutachter: Prof. Dr. sc. agr. Dr. h.c. mult. Michael Böhme

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2018

Publikationen

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erzielten Recherchen und Ergebnisse wurden in den folgenden Veröffentlichungen detailliert beschrieben.

- Veröffentlichung 1:** Scharff C. 2015. Use of microalgae as renewable resources. *Journal of Central European Green Innovation*. 3(3): 149–156.
(Kapitel 2.1.2, S. 6)
- Veröffentlichung 2:** Scharff C., Schroeder F.-G. und Arnold W. 2013. The use of high-frequency electromagnetic radiation for an increased productivity of microalgae in closed systems- a concept. *Acta Horticulturae*. 1004: 93–99. (Kapitel 2.2.3.2, S. 23)
- Veröffentlichung 3:** Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017a. Cultivation of microalgae in closed systems under artificial lighting. *Acta Horticulturae* 1170: 1157–1164.
(Kapitel 4.1.2, S. 49)
- Veröffentlichung 4:** Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2016. Influence of different light irradiation regimes on growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Acta Horticulturae*. 1110: 91–98. (Kapitel 4.2.2, S. 60)
- Veröffentlichung 5:** Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017b. Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. *Acta Horticulturae*: 1170, 1149–1156. (Kapitel 4.3.2, S. 70)

Zusätzliche, nicht publizierte Ergebnisse, die im Rahmen der Dissertation erzielt wurden, werden in den Kapiteln 4.4–4.7 beschrieben und im Kapitel 5 diskutiert.

Aktive Teilnahmen an Tagungen und Symposien

- ZENFE workshop, Gyöngyös, Ungarn, Vortrag und Veröffentlichung: “Use of microalgae as renewable resources” (Journal of Central European Green Innovation), 29.9./30.9.14
- 29. International Horticultural Congress, Brisbane, Australia, Vortrag und Veröffentlichung: „Influence of different light irradiation regimes on growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* “ (Acta Horticulturae), 17.8.–22.8.14
- 10th Anniversary International Symposium 2013, Center for Environment, Health and Field Sciences, Chiba University, Chiba, Japan, Vortrag: „Use of algae in plant factories - potential and perspectives of the green cell factories”, 29.11.13
- International Conference and Exhibition on Soilless Culture, Shanghai, China, Vortrag und Veröffentlichung: „The Use of High-Frequency Electromagnetic Radiation for an Increased Productivity of Microalgae in Closed Systems - a Concept” (Acta Horticulturae), 22.5.–25.5.12

Bearbeitung von Forschungsprojekten

Die Bearbeitung erfolgte u. a. im Rahmen von drei vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) geförderten Kooperationsprojekten:

- **„Nutzung einer Mikrowellenmodifikation an Algen für neue Applikationsfelder; Untersuchung der an Algen ablaufenden Mechanismen bei einer Mikrowellenbehandlung“**
Förderkennzeichen: KF2223306MD1
Projektträger: AiF Projekt GmbH
Laufzeit: 1.12.11–28.2.14
- **„Stimulierung von internen Anregungsprozessen in Algen durch eine zusätzliche kontinuierliche oder gepulste UV-Strahlung; Untersuchung der internen Prozesse in Algenzellen bei zusätzlicher UV-Strahlung“**
Förderkennzeichen: 2223307AK2
Projektträger: AiF Projekt GmbH
Laufzeit: 1.5.2012–30.6.14
- **„Kompakter Reaktor für die Behandlung von flüssigen, biologischen Medien; Untersuchung der internen Prozesse und Abhängigkeiten“**
Förderkennzeichen: 16KN016828
Projektträger: VDI/VDE Innovation + Technik GmbH
Laufzeit: 1.6.2014–28.2.17

Vorwort

Zunächst bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wulf Diepenbrock von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, der mir durch seine Unterstützung und Vertrauen die Möglichkeit gegeben hat, die kumulative Dissertation in Kooperation mit der Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden anfertigen zu können. Gleichzeitig möchte ich mich für die produktiven Ideen während der Bearbeitung der Dissertation bedanken, die der Arbeit eine notwendige Orientierung gaben.

Bei Prof. Dr. agr. Prof. h. c. Fritz-Gerald Schröder bedanke ich mich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Dabei gilt besonderer Dank der Förderung zur Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen, die für mich sehr bereichernd waren. Viele wissenschaftliche, aber auch persönliche Gespräche und Diskussionen haben den Fortschritt der Arbeit geprägt und mich motiviert.

Bei Frau Dr. Monika Wensch-Dorendorf bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten und der Einführung in die SAS-Programmierung.

Den Mitarbeitern der GMBU e.V. Halle und Dresden unter der Leitung von Dr. Klaus Krüger und Dr. Helfried Haufe danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei Versuchsfragen, der Analytik der Algenproben und dem gegenseitigen Wissenstransfer. Dadurch konnten die Grundlagen für die Durchführung der Versuche geschaffen werden.

Ein herzlicher Dank gilt auch den mitarbeitenden Studenten und Praktikanten, ohne deren fleißige Mitarbeit und vielen Stunden im Labor das gewünschte und notwendige Versuchsspektrum nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Nico Domurath möchte ich ganz besonders für die vielen motivierenden Gespräche und konstruktiven sowie produktiven Ideen danken. Ein großer Dank gilt auch Dr. Adelheid Wolter, Dipl.-Ing (FH) Sebastian Wolter und Dr. Mathias Schröder für die Hinweise beim Korrekturlesen.

Im höchsten Maße bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen, die mir zu jeder Zeit Motivation gaben und den Rücken stärkten. Insbesondere meinen Eltern danke ich für die stetige Förderung und Forderung, aber auch für die Geduld und das große Vertrauen, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend danke ich dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie für die Förderung der Forschungsprojekte und der Sächsischen Aufbaubank für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des ESF-Promotionsstipendiums.

Claudia Scharff

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	i
II	Abkürzungsverzeichnis	iv
III	Abbildungsverzeichnis	vii
IV	Tabellenverzeichnis	xi
1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	2
2	Stand des Wissens	4
2.1	Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe	4
2.1.1	Überblick zur Nutzung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffquelle	4
2.1.2	Veröffentlichung 1	6
2.2	Elektromagnetische Strahlung	15
2.2.1	Einteilung und grundlegende Effekte	15
2.2.2	Sichtbares Licht	17
2.2.3	Mikrowellenstrahlung	21
2.2.3.1	Grundlagen zu Mikrowelleneffekten	21
2.2.3.2	Veröffentlichung 2	23
2.2.4	UV-Strahlung	32
3	Material und Methoden	33
3.1	Mikroalgenstämme	33
3.1.1	<i>Chlorella vulgaris</i>	33
3.1.2	<i>Scenedesmus obliquus</i>	34
3.2	Kultivierungsbedingungen	35
3.2.1	Algenanzucht und Vorkultivierung	35
3.2.2	Versuchsanlage	35
3.3	Analytische Methoden	36
3.3.1	Bestimmung der optischen Dichte	36
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	36
3.3.3	Berechnung der Wachstumsrate	37
3.3.4	Bestimmung der Zellgröße	37
3.3.5	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	37
3.3.6	Nitratbestimmung	37
3.3.7	Biotrockenmassebestimmung	38
3.3.8	Ermittlung des täglichen bzw. Gesamtlichtintegrals	38

3.3.9	Ermittlung der Inhaltsstoffe aus der Algentrockenmasse.....	38
3.3.10	Rasterelektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen	38
3.4	Statistik.....	39
3.5	Mikroalgenbehandlungen	40
3.5.1	Versuchsgrundaufbau	40
3.5.2	Belichtung.....	40
3.5.3	UV-Behandlung.....	41
3.5.3.1	Messaufbau.....	41
3.5.3.2	Vorversuche	43
3.5.3.3	Weiterführende Versuche.....	43
3.5.4	Mikrowellenbehandlung.....	44
3.5.4.1	Vorversuche	44
3.5.4.2	Messaufbau.....	44
3.5.4.3	Versuchsdurchführung	46
3.5.5	CO ₂ -Begasung	46
3.5.5.1	Ausgangspunkt	46
3.5.5.2	Versuchsaufbau	47
3.5.6	Nitratversuch	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Kultivierung von Mikroalgen unter Kunstlicht.....	48
4.1.1	Kurzfassung der Veröffentlichung	48
4.1.2	Veröffentlichung 3.....	49
4.2	Einfluss verschiedener Lichtregime auf das Wachstum von <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Scenedesmus obliquus</i>	50
4.2.1	Kurzfassung der Veröffentlichung	50
4.2.2	Veröffentlichung 4.....	51
4.3	Einfluss verschiedener Photoperioden auf das biochemische Profil von <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Scenedesmus obliquus</i>	68
4.3.1	Kurzfassung der Veröffentlichung	68
4.3.2	Veröffentlichung 5.....	68
4.4	Untersuchungen zum Einfluss von UV-Strahlung auf Algenzellen.....	79
4.4.1	Ergebnisse Vorversuche	79
4.4.2	Ergebnisse weiterführende Versuche	80
4.5	Untersuchungen zum Einfluss von Mikrowellen auf Algenzellen.....	81
4.5.1	Ergebnisse Vorversuche	81
4.5.2	Ergebnisse Hauptversuche.....	81
4.5.2.1	Ergebnisse der Mikrowellenbehandlung.....	81
4.5.2.2	Hochauflösende Temperaturmessung	85

4.6	Ergebnisse mit zusätzlich CO ₂	87
4.7	Ergebnisse mit zusätzlich Nitrat.....	89
4.8	Ergebnisse und Diskussion der REM Untersuchungen.....	92
4.8.1	Ergebnisse der REM-Untersuchungen	92
4.8.2	Diskussion der REM-Untersuchung.....	97
5	Zusammenfassende Diskussion.....	98
5.1	Arbeitsziel	98
5.2	Wachstumsprofile und Biomassebildung.....	98
5.3	Einfluss auf die Stoffwechselprodukte.....	105
5.3.1	Proteine.....	105
5.3.2	Chlorophyllgehalt	108
5.3.3	Carotinoide	111
5.3.4	Fettsäuregehalt.....	114
5.3.5	Weitere Inhaltsstoffe.....	123
5.4	sonstige Ergebnisse	123
5.4.1	Axenische Kulturen	123
5.4.2	Methodenvergleich zur Chlorophyllbestimmung	123
5.4.3	Optische Dichte als Wachstumsindikator.....	124
6	Ausblick.....	125
7	Zusammenfassung	127
	Summary.....	130
	Literaturverzeichnis.....	133
	Anhang	149
A 1	Lichtsättigungskurve	149
A 2	Emissionsspektren verwendeter Leuchtmittel.....	149
A 3	Ergebnisse UV-Bestrahlung	151
A 4	Ergebnisse Mikrowellenversuche	152
A 5	Ergebnisse CO ₂ -Versuche	153
A 6	Auswertung Gesamtlichtintegrals	154
A 7	Zellgehalt und volumetrischer Ertrag.....	158
A 8	Statistische Auswertung	162
A 9	Ermittlung der Zellgewichte.....	167
A 10	Entwicklung Chl a-Gehalt und Zellzahl in Abhängigkeit der Belichtung	167
A 11	Methodenvergleich zur Chlorophyllbestimmung.....	168
A 12	Abhängigkeit zwischen der OD ₇₅₀ und der Zellzahl.....	169
	Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath	170
	Lebenslauf	171

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen und chemische Verbindungen

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ALA	α -Linolsäure (C18:3n3)
ARA	Arachidonsäure (C20:4n6)
arithm.	arithmetische Mittel
ATP	Adenosintri-phosphat
APC-7	Amphenol Precision Connector, Hochfrequenz-Stecker zum Anschluss von Hochfrequenzkabel mit 7 mm Durchmesser
β -Car	β -Carotin
BTM	Biotrockenmasse
Asta	Astaxanthin
C	Kohlenstoff
c	Konzentration
c_v	Ausbreitungsgeschwindigkeit
CCM	CO ₂ -konzentrierende Mechanismen
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
Cl	Chlor
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DGLA	Dihomogammalinolensäure (C20:2n6)
BCA	Bicinchoninsäure
DHA	Docosahexaensäure (C20:6n3)
DLI	Gesamtlichtintegral (daily light integral)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Docosapentaensäure (C22:5n3)
E	Energie
E_λ	Extinktion bei einer Wellenlänge λ
EDA	Eicosadiensäure (C20:2n6)
EHF	extremely high frequency
EPA	Eicosapentaensäure (C20:5n3)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETA	Eicosatetraensäure (C20:4n3)
ETrA	Eicosatriensäure (C20:3n3)
f	Frequenz
FL	Leuchtstoffröhren (fluorescent lamp)
GLA	Gammalinolensäure (C18:3n6)
GMBU e.V.	Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien eingetragener Verein

INHALTSVERZEICHNIS

h	Plancksche Wirkungsquantum
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HID	Hochdruck-Gasentladungslampen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
HTW	Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
I ₁ , I ₀	Intensität des transmittierten Lichts, Intensität des einfallenden Lichts
IR	Infrarot
KNO ₃	Kaliumnitrat
LA	Linolsäure (C18:2n6)
LED	Leuchtdiode (light emitting diode)
LHC	Lichtsammelkomplex (light harvesting complex)
LHCP	Lichtsammelkomplexproteine (light harvesting complex proteins)
MAA	Mycosporin-ähnliche Aminosäuren
MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids)
Na	Natrium
N	Stickstoff
n	Stichprobengröße
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
n. b.	nicht bestimmt
O ₂ , ¹ O ₂ [•] , O ₂ ^{•-}	Sauerstoff, Singuletsauerstoff, Hyperoxidanion
OD ₇₅₀	optische Dichte bei 750 nm
OA	Ölsäure (C18:1n-9)
OLED	organische Leuchtdiode (organic light emitting diode)
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
P	Phosphor
P _p	Pumpleistung
PA	Palmitinsäure (C16:0)
PBR	Photobioreaktor
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (photosynthetic active radiation)
PFD	Photonenflussdichte
PS I/ PS II	Photosystem I / Photosystem II
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
Q	Wärmemenge
RBG	rot:blau:grün
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphatase Carboxylase-Oxygenase
SA	Stearinsäure (C18:0)

<i>S. obliquus</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>
SDA	Steraridonsäure (C18:4n-3)
sp.	nicht näher bezeichnete Spezies
SUFA	gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids)
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol, Triglyceride
TLI	Gesamtlichtintegral (Total Light Integral)
UV	ultraviolett
VIS	visible light
VLC-PUFA	sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (very long chain polyunsaturated fatty acids)
ZZ	Zellzahl

Symbole/Indizes

c_a, c_b, c_{Car}	Konzentration Chlorophyll a, Konzentration Chl b, Konzentration Carotinoide
Δ	Delta (Differenzdarstellung)
Δ -xD	Delta-x-Desaturase, x steht für den Ort der eingefügten Doppelbindung
E_B, E_Z	Behandlungsenergie, Energie pro Zyklus
ϵ_λ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge [nm]
ω -n	Omega, beschreibt die Position der Doppelbindung vom gegenüberliegenden Ende der Carboxylgruppe
$\%_{rel}, \%_{abs}$	prozentualer Anteil bezogen auf den relative Gehalt, prozentualer Anteil bezogen auf den absoluten Gehalt
TLI_X, TLI_{X_Zelle}	Gesamtlichtintegral bezogen auf das Produkt X bzw. Bezogen auf den Gehalt X pro Zelle
t_Z, t_B, t_t	Zeit pro Zyklus, Behandlungszeit, tägliche Lichtdauer
μ, μ_{max}	Wachstumsrate [d^{-1}], maximale Wachstumsrate

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Wachstumsphasen und der Abnahme von Nährstoffen, 1: Adaptionsphase (Lag-Phase), 2: exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase), 3: stationäre Phase und 4: Absterbephase (nach Grobbelaar 2007)	4
Abb. 2: Microalgae species <i>Scenedesmus obliquus</i> (left) and <i>Chlorella vulgaris</i> (right) with 2000x magnification (own illustration)	7
Abb. 3: Microalgae use in biorefinery concept (own illustration)	11
Abb. 4: Einteilung und Erzeugung elektromagnetischer Strahlung	15
Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Lichteinflussgrößen an einer Mikroalgenzelle (nach Barra et al. 2014)	18
Abb. 6: Scheme of Test-Set up: Microalgae culture in a flat test vessel in a microwave chamber with an infrared camera for in-situ temperature control.	30
Abb. 7: Schematische Darstellung des Zellaufbaus von <i>C. vulgaris</i> (links, Vogel 2011); lichtmikroskopische Aufnahme (rechts, 2000-fache Vergrößerung, Keyence VHX100, eigene Aufnahme)	33
Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>S. obliquus</i> , (2000-fache Vergrößerung, Keyence VHX100, eigene Aufnahme)	34
Abb. 9: Versuchsanlage mit 1) Gaswaschflaschen, 2) Stopfen mit Schlauchsystem zur Probenahme, Belüftung und Ableitung der Abluft, 3) Kolben mit Algensuspension, 4) Lichtanlage mit Zeitschaltuhr, 5) Heizstab, 6) Filterschlauch der Filteranlage zur Umwälzung des Wassers, 7) Magnetrührer, 8) Glasbecken, 9) Glaszylinder mit Wasser zur Kontrolle der Abluft	35
Abb. 10: Bestimmung der Zellzahl innerhalb eines Großquadrates; grün = gezählt, rot = nicht gezählt (Hüber 2014)	36
Abb. 11: Ablauf zur Bilderstellung mit einem REM mit EDX-Detektor (Ziel 2003)	39
Abb. 12: Anordnung der Belichtung, jede Leuchtstoffröhre (gelb) wurde halbseitig durch lichtundurchlässige Folie abgedeckt (grau)	40
Abb. 13: Anordnung bei LED-Belichtung für 2 Kolben	41
Abb. 14: Bypassreaktor zur Behandlung mit UV B Strahlung (Sommer 2012)	41
Abb. 14: Bypassreaktor zur Behandlung mit UV B Strahlung (Sommer 2012)	41
Abb. 15: Bypass-System zur Bestrahlung mit UV-A-Strahlung (Sommer 2012)	42
Abb. 16: Schema zur Bypassführung nach Weiß (2015) (I: UV-Lampe (rechts Nahaufnahme), II: doppelwandiger Glasmantel zum Durchströmen der Algensuspension, III: Pumpe, IV: Probenahme, 1: Kultivierungskolben, 2 c: Ausgang, 2 d: Eingang)	42
Abb. 17: Experimenteller Messaufbau zur Mikrowellenbehandlung (1: Applikator, 2: Hohlleiter, 3: Magnetron)	44
Abb. 18: Innenansicht der Glasrohrlast (links), Schaltnetzteil (rechts).....	45
Abb. 19: Schematische Abbildung zur Bypassführung zur Mikrowellenbehandlung zwischen dem Applikator und dem Behandlungskolben	45
Abb. 20: Compared specific growth rates (mean values and bars symbolizes standard derivation) of LED and FL lighted <i>C. vulgaris</i> cultures over 240 h cultivation time	52

Abb. 21: Specific growth rate of <i>C. vulgaris</i> as a function of 4 investigated light/dark regimes calculated by cell concentration, bars symbolize standard variation	66
Abb. 22: Specific growth rate of <i>S. obliquus</i> as a function of 6 investigated light/dark regimes calculated by cell concentration, bars symbolize standard variation	67
Abb. 23: Chl a / Car ratio for both species for all investigated regimes and species	67
Abb. 24: Achieved volumetric content of linoleic acid, α -linolenic acid, chl a, chl b, and protein in <i>C. vulgaris</i>	75
Abb. 25: Achieved volumetric content of linoleic acid, α -linolenic acid, chl a, chl b, and protein in <i>S. obliquus</i>	75
Abb. 26: Achieved volumetric content of carotenoids in <i>C. vulgaris</i>	76
Abb. 27: Achieved volumetric content of carotenoids in <i>S. obliquus</i>	76
Abb. 28: Biotrockenmasse und Zellzahl für <i>C. vulgaris</i> für verschiedene UV-A und UV-B-Behandlungen gegenüber ihrer versuchsinternen Kontrollen am Versuchsende, Tag 1 = Starttag; Balken stellen Standardabweichung dar	79
Abb. 29: Darstellung der Absorption durch die Algen (nach Hammer 2012); Untersuchung von 10 MHz bis 18 GHz (dargestellt bis 16,2 GHz); Nummern kennzeichnen Marker, die in Tab. 16 näher erklärt werden	81
Abb. 30A-B: Biomasseertrag und Zellzahl bei <i>C. vulgaris</i> (A) (Behandlung 1: 10 x 30 s + 10 x 15 s, Behandlung 2: 15 x 15 s am Tag 10) und <i>S. obliquus</i> (B) (Behandlung 1: 1x bis 38°C, Behandlung 2: 10 x 15 s am Tag 4/7/10) nach 240 h; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2)	82
Abb. 31: Normierung des Wärmeeintrages in <i>C. vulgaris</i> (Behandlung 2: 15 x 15 s).....	84
Abb. 32: Normierung des Wärmeeintrages in <i>S. obliquus</i> (Behandlung 2: 10 x 15 s).....	84
Abb. 33A-B: Experimentelle Versuchsanordng der IR-Kamera (A) und Ankopplung an die Versuchsanlage (B)	86
Abb. 34A-B: Temperaturänderung bei einer Mikrowellenleistung von 200 W (A) und 1200 W (B) (Höpfner 2014)	86
Abb. 35: Biomasseertrag und Zellzahl von <i>C. vulgaris</i> bei verschiedenen CO ₂ -Konzentrationen in der Begasung nach 264 h (12 Tage) bzw. 240 h (11 Tage); Balken stellen Standardabweichung dar, n = 1 außer CO _{2, 075%} : n = 3).....	87
Abb. 36: Gelbfärbung der <i>C. vulgaris</i> -Kultur nach 264 h, links +1% CO ₂ , rechts: mit CO ₂ aus Umgebungsluft	88
Abb. 37: Vergleich der pH-Wert Entwicklung in Abhängigkeit von der Lichtdauer bzw. durch eine erhöhte CO ₂ -Konzentration von 0,75 % am Beispiel von <i>C. vulgaris</i> zum Probe-nahmezeitpunkt	89
Abb. 38A-B: Vergleich der Wachstumsraten (A) und der Biotrockenmasse und Zellzahl nach 240 h von <i>C. vulgaris</i> zwischen der Nitratvariante und der Kontrolle; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2	89
Abb. 39: Zeitliche Entwicklung der Zellzahl und der zellulären Chl a-Konzentration in der Nitratvariante im Vergleich zur Kontrolle von <i>C. vulgaris</i> , Balken symbolisieren Standardabweichung, n = 2.....	90
Abb. 40A-B: REM-Aufnahme der Probe C.v.2, Maßstab 2 μ m (A) und 200 nm (B) (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150)	92

Abb. 41A-D: REM-Aufnahmen von *C. vulgaris*-Zellen aus Versuchen mit verschiedenen Photoperioden bzw. Lichtquellen (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150, Maßstab: 1 µm, A: C.v.1, B: C.v.2, C: C.v.3, D: C.v.4)..... 93

Abb. 42A-B: Ausgewählte Fläche für die Elementanalyse aus einer Probe von *C. vulgaris* (C.v.2) (A); Spektrum der Elementanalyse für diesen Bildausschnitt (B) 93

Abb. 43: Flächenanalyse einzelner Elemente (EDX-Analyse) von *C. vulgaris* für den Bildausschnitt von Abb. 42A mit einem Maßstab von 50 µm 94

Abb. 44A-B: REM-Aufnahmen von *S. obliquus*-Zellen (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150, A: 18:6-h, B: 24:0-h 95

Abb. 45A-B: Ausgewählte Fläche für die Elementanalyse aus einer Probe von *S. obliquus* (S.o.1) (A); Spektrum der Elementanalyse für diesen Bildausschnitt (B) 95

Abb. 46: Flächenanalyse einzelner Elemente (EDX-Analyse) von *S. obliquus* für den Bildausschnitt von Abb. 45A mit einem Maßstab von 5 µm 96

Abb. 47: Fettsäurebiosynthesewege in Mikroalgen (nach Huerlimann et al. 2014, Kaye et al. 2015 und Fernandes et al. 2016); E = Elongase, Δ-xD = Desaturase, SA= Stearinsäure, OA = Ölsäure, LA = Linolsäure, GLA = γ-Linolensäure, DGLA = Dihomogammalinolensäure, ARA = Arachidonsäure, EDA = Eicosadiensäure, ALA = α-Linolensäure, SDA = Steraridonsäure, ETA = Eicosatetraensäure, EPA = Eicosapentaensäure, DPA = Docosapentaensäure , DHA = Docosahexaensäure, ETrA = Eicosatetriensäure..... 118

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abb. A 1: Lichtsättigungskurve (Anhäuser 1999) 149

Abb. A 2: Emissionsspektrum Leuchtstoffröhre: Osram, L36 W/840, Lumilux 149

Abb. A 3: Emissionsspektrum UV-A-Lampe: BLB T8/18 LS010 (Peak bei 370 nm)..... 150

Abb. A 4: Emissionsspektrum UV-B-Lampe mit dem Leuchtstoff (Peak bei 312 nm) .. 150

Abb. A 5: Emissionsspektrum der LED mit den eingesetzten Leuchtdioden LD W5AM deep blue (Peak bei 455 nm), LD WAM deep true green (Peak bei 528 nm) und LH W5AM hyper red (Peak bei 657 nm) 150

Abb. A 6: A-D: Darstellung der Ergebnisse der relativen Anteile untersuchter Inhaltsstoffe von *C. vulgaris* bei verschiedenen UV-A- und UV-B-Behandlungen (A: Proteine, B: Fettsäuren, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Balken stellen Standardabweichung dar, alle UV- Behandlungen n = 1..... 151

Abb. A 7A-D: Ergebnisse relativer Anteile untersuchter Inhaltsstoffe für *C. vulgaris* (A: Proteine, B: Linol- und α-Linolensäure, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Behandlung 1: 10 x 30 s + 10 x 15 s, Behandlung 2: 15 x 15 s am Tag 10; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2) 152

Abb. A 8A-D: Ergebnisse relativer Anteile untersuchter Inhaltsstoffe für *S. obliquus* (A: Proteine, B: Fettsäuren, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Behandlung 1: kontinuierlich bis 38°C, Behandlung 2: 15 x 10 s am Tag 4/7/10, Balken stellen die Standardabweichung dar, n = 2) 152

Abb. A 9A-D: Ergebnisse relativer Anteile analysierter Inhaltsstoffe von *C. vulgaris* bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Begasung am Versuchsende nach 264 h (12 Tage, Starttag = Tag 1) bzw. 240 h (11 Tage) (A: Protein, B: Linol- und α -Linolensäure, C: Carotinoide (β -Carotin, Lutein, Astaxanthin), D: Chlorophyll a und b; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 1 außer für CO₂, 075%: n = 2 153

Abb. A 10A-B: Zellulärer Chl a-Gehalt in *C. vulgaris* (A) und *S. obliquus* (B) über die Versuchsdauer bei unterschiedlichen Behandlungen aus methanolischen Extrakten 167

Abb. A 11A-B: Vergleich Chl a (A)- und Chl b (B)-Zellgehalte aus der Bestimmung gefrier-getrockneter Proben mittels HPLC mit den Ergebnisses aus methanolischen Extrakten von *C. vulgaris* (n = Stichprobengröße, Balken stellen Standardabweichung dar) 168

Abb. A 12A-B: Vergleich Chl a (A)- und Chl b (B)-Zellgehalte aus der Bestimmung gefrier-getrockneter Proben mittels HPLC mit den Ergebnisses aus methanolischen Extrakten von *S.obliquus* (n = Stichprobengröße, Balken stellen Standardabweichung dar) 168

Abb. A 13A-B: Gegenüberstellung der OD₇₅₀ zur Zellzahl bei *C. vulgaris* (A) und *S. obliquus* (B); Werte aus allen Versuchen 169

IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kultivierungsformen nach der Energie- und Kohlenstoffquelle	5
Tab. 2: Durchschnittliche Zusammensetzung der untersuchten Spezies (bezogen auf die Hauptbestandteile an der Trockenmasse in %) (nach Becker 1994)	6
Tab. 3: Open and closed systems for microalgae production.....	9
Tab. 4: Comparison of open and closed systems.....	9
Tab. 5: Examples for the application of high value compounds	10
Tab. 6: Anregungsenergien verschiedener Effekte (nach Ramundo-Orlando 2010)	16
Tab. 7: Potentielle Angriffspunkte und Effekte an einer Zelle durch elektromagnetische Strahlung (nach Hunt et al. 2009 und Ramundo-Orlando 2010).....	16
Tab. 8: Versuchsaufbau der Vorversuche zur UV-Behandlung (Tag 1 = Starttag)	43
Tab. 9: Behandlungsschema für <i>C. vulgaris</i> (Tag 10) und <i>S. obliquus</i> (Tag 4/7/10)	46
Tab. 10: DLI results and power consumption by lights for biomass production after 240 h cultivation in 20:4-h light:dark regime	53
Tab. 11: Mean values of growth parameters and metabolites (out of methanolic extractions and dry matter) after 240 h of cultivation with \pm standard deviations according to the volumetric production. Different letters indicate significant differences (p-value < 0.05) of the parameter compared from LED to FL	55
Tab. 12: Summary of results (means) obtained (cell concentration, chlorophyll content, dry weight) after 240 hours of <i>C. vulgaris</i> (\pm standard derivation).....	66
Tab. 13: Summary of results (means) obtained (cell concentration, chlorophyll content, dry weight) after 240 hours of <i>S. obliquus</i> (\pm standard derivation).....	66
Tab. 14: TLI results [$\text{g L}^{-1} \text{ mol m}^{-2}$] for volumetric production of protein in <i>C. vulgaris</i> and <i>S. obliquus</i> after 240 h cultivation	74
Tab. 15: Fettsäurenverhältnis nach einer UV-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle	80
Tab. 16: Marker zur APC-7 Messung	81
Tab. 17: Leistungsbereich bei der Behandlung von <i>C. vulgaris</i> (Behandlung am Tag 10). 82	
Tab. 18: Leistungsbereich bei der Behandlung von <i>S. obliquus</i> (Behandlung am Tag 4/7/10)	82
Tab. 19: Ergebnisse der Analyse aus gefriergetrockneten Proben des Nitratversuches im Vergleich zur Versuchskontrolle (\pm entspricht der Standardabweichung, % _{rel} bzw. % _{abs} entspricht der Abweichung zum relativen Gehalt bzw. zur absoluten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, n = 2)	91
Tab. 20: Proben- und Versuchsauswahl für REM-Untersuchungen	92
Tab. 21: Durchschnittliche Elementverteilung in % für <i>C. vulgaris</i> -Zellen (n. b. = nicht bestimmbar)	94
Tab. 22: Durchschnittliche Elementverteilung der Proben von <i>S. obliquus</i>	96

Tabellenverzeichnis Anhang

Tab. A 1: DLI [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$]	154
Tab. A 2: TLI bezogen auf den zellulären Gehalt von Produkt X ($\text{TLI}_{X,Z}$) für <i>C. vulgaris</i> bei einer Intensität von $324,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (FL) bzw. $305,0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LED), n = Stichprobengröße, \pm = Standardabweichung	154
Tab. A 3: TLI bezogen auf den volumetrischen Ertrag von Produkt X (TLI_X) für <i>C. vulgaris</i> bei einer Intensität von $324,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (FL) bzw. $305,0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LED), n = Stichprobengröße, \pm = Standardabweichung	155
Tab. A 4: TLI bezogen auf den zellulären Gehalt von Produkt X (TLI_X) für <i>S. obliquus</i> bei einer Intensität von $306,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (FL), n = Stichprobengröße, \pm = Standardabweichung	156
Tab. A 5: TLI bezogen auf den volumetrischen Ertrag von Produkt X (TLI_X) für <i>S. obliquus</i> bei einer Intensität von $306,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (FL), n = Stichprobengröße, \pm = Standardabweichung	157
Tab. A 6: Mittlerer Zellgehalt der Inhaltsstoffe in <i>C. vulgaris</i> nach 240 h, n = Stichprobenzahl, \pm Standardabweichung	158
Tab. A 7: Mittlerer Zellgehalt der Inhaltsstoffe in <i>S. obliquus</i> nach 240 h, n = Stichprobenzahl, \pm Standardabweichung	159
Tab. A 8: Mittlerer volumetrische Ertrag der Inhaltsstoffe mit <i>C. vulgaris</i> nach 240 h, n = Stichprobenzahl, \pm Standardabweichung	160
Tab. A 9: Mittlerer volumetrische Ertrag der Inhaltsstoffe mit <i>S. obliquus</i> nach 240 h, n = Stichprobenzahl, \pm Standardabweichung	161
Tab. A 10: Endwertbestimmung und signifikante Unterschiede nach 240 h Versuchsdauer in <i>C. vulgaris</i> (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$)	162
Tab. A 11: Endwertbestimmung und signifikante Unterschiede nach 240 h Versuchsdauer in <i>S. obliquus</i> (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$)	162
Tab. A 12: Regressionsanalyse für <i>C. vulgaris</i> auf Basis der Mittelwerte der Zellgehalte der analysierten Inhaltsstoffe nach 240 h, $p < 0,05$	163
Tab. A 13: Regressionsanalyse für den volumetrischen Gehalt der analysierten Inhaltsstoffe für <i>C. vulgaris</i> nach 240 h, $p < 0,05$	164
Tab. A 14: Regressionsanalyse für <i>S. obliquus</i> auf Basis der Mittelwerte der Zellgehalte der analysierten Inhaltsstoffe nach 240 h, $p < 0,05$	165
Tab. A 15: Regressionsanalyse für den volumetrischen Gehalt der analysierten Inhaltsstoffe für <i>S. obliquus</i> nach 240 h, $p < 0,05$	166
Tab. A 16: durchschnittliches Zellgewicht (n = Stichprobenzahl, \pm = Standardabweichung, n. b. = nicht bestimmt)	167

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Mikroalgen sind eukaryotische Mikroorganismen, die eine Reihe von kommerziell nutzbaren Verbindungen produzieren können. Wirtschaftlich interessante Produkte sind dabei u. a. Proteine, Vitamine, Fettsäuren und Carotinoide. Hauptanwendungsgebiete für Mikroalgenprodukte sind bis heute der Lebens- und Nahrungsmittelergänzungssektor (ca. 75 %) sowie der Futtermittelsektor z. B. in Aquakulturen (Rosello-Sastre und Posten 2010). Aber auch für andere Wirtschaftsbereiche, wie die Pharmazie- und Biokraftstoffindustrie, gewinnen Mikroalgen als Produktionsorganismen für schnell nachwachsende Rohstoffe an Bedeutung (Kula et al. 2014). Gegenüber der Nutzung von höheren Pflanzen zeichnen sie sich u. a. durch folgende Eigenschaften aus (Schenk et al. 2008, Wu et. al. 2012, Griffiths et al. 2011a, Ibanez und Cifuentes 2013, de Morais et al. 2015):

- höhere Photonenumwandlungseffizienz (bezogen auf Biomasseproduktion pro Hektar),
- kein Aufbau nicht-photosynthetisch aktiver Gewebe,
- nahezu ganzjährige Produktion möglich (kontinuierliche Bereitstellung z. B. von Öl),
- 10 bis 100-fach höhere Ölproduktionsraten im Vergleich zu anderen Bioenergiepflanzen wie Mais und Ölpalme,
- Nutzung von Salz- und Abwässern zur Reduktion vom Frischwasserbedarf,
- CO₂-neutrale Kraftstoffproduktion in Verbindung mit CO₂-Bindung,
- keine Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion durch Unabhängigkeit von der Bodenbeschaffenheit (Schonung der Ressourcen, Nutzung von Brachflächen)
- kein Bedarf an Herbiziden und Pestiziden,
- hohe Anpassungsfähigkeit an veränderbare Umweltbedingungen in Verbindung mit der Bildung hochwertiger, bioaktiver Stoffwechselprodukte.

Mikroalgen können ebenfalls als Modellorganismen genutzt werden, da grundlegende metabolische Abläufe denen höherer Pflanzen ähneln. So wurden z. B. wesentliche Erkenntnisse über die Photosynthese auf Basis der Untersuchungen an Mikroalgen als Untersuchungsorganismen erlangt. Damit konnte das Verständnis für die Stoffwechselfvorgänge sowohl für Algen als auch Pflanzen erhöht werden. (Rai und Gaur 2001)

Derzeitig erfolgt die Mikroalgenproduktion zu 98 % in offenen Systemen (FAO 2012). Diese zeichnen sich zwar durch einen kostengünstigen Betrieb und preiswerte Bauweise aus, eine gezielte Steuerung der Prozessparameter und dadurch auch des Produktionsziels ist jedoch in solchen Anlagen stark limitiert. Geschlossene Systeme, wie z. B. die Produktion in Photobioreaktoren (PBR), erweisen denen gegenüber daher deutliche Vorteile auf, da eine kontrollierte Produktion phototropher Organismen unter definierten Bedingungen möglich ist. Jedoch wird eine effiziente und ökonomische Produktion durch spezifische Einflussgrößen, sogenannte „Bottlenecks“, limitiert. Derartige Faktoren stellen nach Bosma (2010) und Carvalho et al. (2011) abiotische (wie z. B. Licht, Temperatur, pH-Wert und Nährstoffe) und biotische Faktoren (wie z. B. die Infektion mit Pathogenen oder die

Nährstoffkonkurrenz mit anderen Organismen) dar. Hohe Produktionskosten sowie ein hoher Energieverbrauch für die Herstellung und Aufbereitung der Inhaltsstoffe stehen der geringen Produktivität und Ausbeute zusätzlich oft negativ gegenüber (Hunt et al. 2009, Carvalho et al. 2011). Je nach Kultivierungsbedingungen und eingesetzter Spezies, aber auch durch tageszeitliche bestimmte Abläufe im Rahmen des zirkadianen Rhythmus, kann das biochemische Profil zudem stark schwanken (de Winter et al. 2014). Es wird daher intensiv an verschiedenen Prozessparametern geforscht, um das Wachstum bzw. die Stoffwechselprozesse zu optimieren, das Verständnis für die Stoffwechselfvorgänge zu erweitern und damit die Ausbeute entlang der Wertschöpfungskette zu erhöhen. Das Ziel dabei ist, ein einen möglichst hohen Gehalt der gewünschten Inhaltsstoffe in den Zellen bei gleichzeitiger Optimierung der Produktionskosten zu erzeugen. (Hunt et al. 2009, Fernandes et al. 2016)

Es gibt verschiedene Strategien, um den Biomassertrag und das biochemische Profil der Algenbiomasse zu modifizieren. Prinzipiell kann man dabei an drei Punkten entlang der Produktionskette durch entsprechende Maßnahmen Einfluss nehmen. Der erste Schritt ist die Selektion der geeigneten Mikroalgenpezies für das Zielprodukt bzw. deren (auch gentechnische) Manipulation. Der zweite Schwerpunkt ist das Kultivierungssystem- und verfahren. Dabei können sowohl das Design in Form von Röhren, Flachplattenreaktoren oder Foliensäcken, die verarbeiteten Materialien, wie z. B. Glas oder Kunststoff, oder die Produktionsfaktoren, wie z. B. die Lichtintensität, die spektrale Zusammensetzung der Lichtquelle, die Nährstoffzusammensetzung und die Temperatur sowie verschiedene Behandlungsparameter wie Mikrowellen und Ultraschall variiert werden. Der dritte Schwerpunkt ist die abschließende, möglichst schonende, Aufbereitung der Algenbiomasse zur Gewinnung sensibler und hochwertiger Inhaltsstoffe. (Hunt et al. 2009, Carvalho et al. 2011, Vigani et al. 2015, Benavente-Valdés et al. 2016)

Ein großes Problem bei der Versuchsauswertung stellt die oftmals geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar. Die Verwendung verschiedener Algenstämme und Medien schränkt außerdem die Vergleichbarkeit der Studien verschiedener Autoren stark ein. Folglich gelten die Ergebnisse dieser Arbeit zunächst speziell für das verwendete Kultivierungsprinzip unter den angegebenen Kultivierungsbedingungen und genutzten Algenstämmen.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit setzt bei der Manipulation der Kultivierungsbedingungen von Mikroalgen in einem geschlossenen System an. Im Mittelpunkt stehen zwei Vertreter aus der Abteilung der Grünalgen (Chlorophyta), *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus*, die mit verschiedenen Bereichen des elektromagnetischen Spektrums (Ultraviolettstrahlung (UV), sichtbares Licht (VIS) und Mikrowellenstrahlung) behandelt werden. Damit sollen Einflussgrößen bei der Kultivierung zur Steigerung der Biomasse- oder Stoffwechselaktivität der ausgewählten Mikroalgen identifiziert werden.

Der Faktor Licht ist eine Haupteinflussgröße bei der Kultivierung phototropher Mikroalgen und kann durch Variation der Intensität und spektralen Zusammensetzung der Lichtquelle verschiedene physiologische Effekte auf die Zellen und deren biochemische Zusammensetzung bewirken. Die Effekte der Mikrowellenbehandlung und UV-Bestrahlung zur Produktivitätssteigerung von Mikroalgen sind auf Grund eines engen Parameterfensters derzeit noch nicht ausreichend identifiziert. Schwerpunkte bei der Mikrowellenbehandlung lagen zudem überwiegend auf dem Zellaufbruch bzw. wurden im Bereich der zellulären Wechselwirkung vor allem in Ländern der ehemaligen Sowjetunion untersucht. Daher ist der Vergleich von Untersuchungen auf diesem Gebiet bzw. der Zugriff auf entsprechende Literatur eingeschränkt.

Aus diesen Gründen wurden folgende Schwerpunkte zur Untersuchung des Einflusses auf Biomasse- und Stoffwechselprozesse für die vorliegende Arbeit definiert:

- 1) Einfluss verschiedener spektraler Lichtzusammensetzungen bei der Belichtung mit Leuchtstoffröhren und Leuchtdioden (Kapitel 4.1)
- 2) Untersuchung und Charakterisierung des Einflusses verschiedener Tag-Nacht-Regime bei der Behandlung im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes (Kapitel 4.2 und 4.3)
- 3) Einfluss von zusätzlicher UV-A- und UV-B-Strahlung (Kapitel 4.4)
- 4) Einfluss von zusätzlicher Mikrowellenstrahlung (Kapitel 4.5)

Einleitend wird zunächst der aktuelle Stand des Wissens zu den Modellorganismen und den Untersuchungsbereichen vorgestellt (Kapitel 2) und der entsprechende technische und methodische Versuchsaufbau im Kapitel 3 dargestellt. Die aus der Recherche sowie experimentell gewonnenen Ergebnisse werden basierend auf den zugehörigen Publikationen kapitelspezifisch in dieser Arbeit vorgestellt (Kapitel 4) und zusammenfassend im Kapitel 5 diskutiert.

Alle Publikationen wurden im Rahmen eines Peer-Review-Verfahren geprüft. Die Abbildungs- und Tabellenbeschriftungen wurden an die fortlaufende Nummerierung dieser Arbeit angepasst.

2 Stand des Wissens

2.1 Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe

2.1.1 Überblick zur Nutzung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffquelle

Grundlagen zur Einteilung von Mikroalgen, der Anwendung in verschiedenen Industriebranchen und zur Produktion in verschiedenen Systemen werden in der Veröffentlichung 1 (Kapitel 2.1.2, S. 6) ausführlich beschrieben. Im folgenden Abschnitt erfolgt daher ein zusammenfassender Überblick.

Als Mikroalgen werden 3–80 μm kleine, Photosynthese betreibende Mikroorganismen bezeichnet, die bei entsprechender Feuchtigkeit ubiquitär vorkommen können. Die Einteilung erfolgt nach Tomaselli (2007) in zehn Gruppen (siehe Veröffentlichung 1). Bei dieser Klassifizierung werden u. a. die Verteilung und Art der Pigmente und die Zellwandbestandteile berücksichtigt.

Die Kultivierung kann in offenen und geschlossenen Systemen erfolgen. Der Betrieb der Reaktoren und Anlagen kann dabei durch drei prinzipiellen Verfahren erfolgen: diskontinuierlich (batch), kontinuierlich und halbkontinuierlich (semi-batch). Im Batch-Modus werden zu Beginn der Produktion alle Ausgangssubstanzen (Nährmedien und Algenkultur) in den Reaktor gegeben und es erfolgt keine weitere Zugabe und Entnahme von Produkten bis zum Ende der Reaktions- bzw. Versuchsdauer. Die batch-Betriebsweise führt zu einer Limitierung von Nährstoffen in Abhängigkeit von der Zeit und der Zellteilung. Bei semi-batch-Verfahren wird ein Teil der Ausgangsstoffe (z. B. Nährstoffe) während der Produktion zugegeben und/oder ein Teil der Produkte abgenommen. Kontinuierliche Verfahren zeichnen sich durch eine ständige Zugabe von Ausgangsstoffen und Abnahme von Produkten aus. Der Batch-Betrieb wird am häufigsten in Versuchen und der industriellen Produktion angewendet (Lee und Shen 2007).

Das Mikroalgenwachstum, definiert als die Zunahme der Zellzahl, kann in batch-Kulturen in vier Phasen unterteilt werden (Abb. 1).

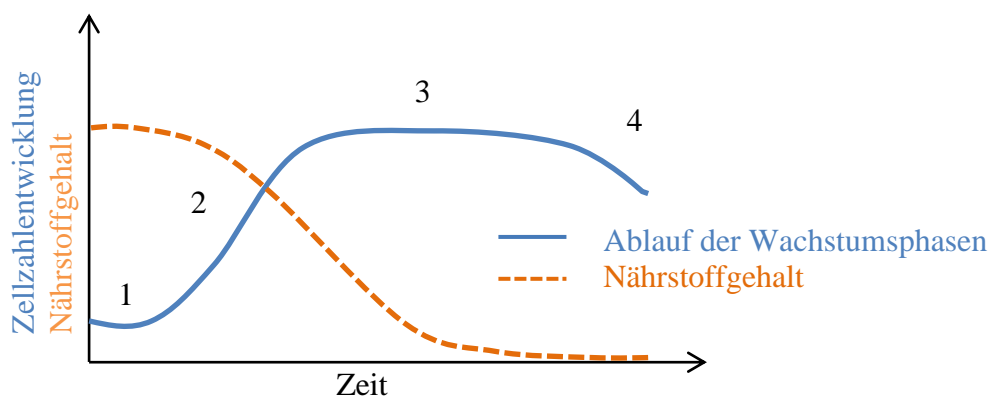


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wachstumsphasen und der Abnahme von Nährstoffen, 1: Adaptionphase (Lag-Phase), 2: exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase), 3: stationäre Phase und 4: Absterbephase (nach Grobbelaar 2007)

In der Adaptions-, der sogenannten Lag-Phase, erfolgt eine Anpassung der Zellen bzw. des Stoffwechsels an die Umgebungsbedingungen. In dieser Phase wächst die Kultur sehr langsam. In der Log-Phase haben sich die Zellen an ihr Nährmedium angepasst und können sich mit ihrer maximalen Teilungsrate vermehren. Die Vermehrung erfolgt exponentiell, das heißt, dass in dieser Phase der Logarithmus der Zellzahl linear mit der Zeit ansteigt und die Teilungsrate der Zellen konstant ist. Durch die Abnahme von Nährstoffen und weiteren limitierenden Faktoren (z. B. die Lichtverfügbarkeit) stellt sich die stationäre Phase ein. Dabei liegen Vermehrung und Absterben der Zellen im Gleichgewicht. Es erfolgt keine bis geringe Zunahme der Zellzahl. Der Stoffwechsel stellt sich auf Kohlenstoff- und Energiespeicherprodukte um. In der sogenannten Sterbephase verringert sich die Zellzahl, da weniger Zellen gebildet werden als aufbrechen/absterben. (Grobbelaar 2007)

Die Kultivierungsformen werden bezogen auf die Energie- und Kohlenstoffquelle in vier Gruppen eingeteilt (Tab. 1). Jedoch ist nicht jede Mikroalgenspezies für jede Kultivierungsform geeignet bzw. fähig und zum anderen wird die biochemische Zusammensetzung der Algenbiomasse durch die Energie- und Kohlenstoffquelle unterschiedlich beeinflusst.

Tab. 1: Kultivierungsformen nach der Energie- und Kohlenstoffquelle

Bezeichnung	Energiequelle	Kohlenstoffquelle
photoautotroph	Licht	anorganisch (z. B. CO ₂)
photoheterotroph	Licht	organisch (z. B. Glucose)
heterotroph	organische Kohlenstoffquellen (z. B. Glucose)	organisch (z. B. Glucose)
mixotroph	Licht und organische Kohlenstoffquellen	organisch und anorganisch

Die Biomasse von Mikroalgen besteht hauptsächlich aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden. Dabei macht Kohlenstoff (C) mit ca. 50 % das Hauptelement aus. (Becker 1994, Sanchez Miron et al. 2003) Eine ausreichende Versorgung mit einer Kohlenstoffquelle ist daher essentiell für die Mikroalgenproduktion. Da Stickstoff mit einem Anteil von ca. 7–10 % an der Biomasse ebenfalls zu den wichtigsten Makroelementen in der Mikroalgenbiomasse zählt, kann eine Manipulation der Stoffwechselaktivität über die Stickstoffverfügbarkeit erfolgen (Becker 1994, Hu 2007). Phosphor (P) ist ein weiteres essentielles Element für das Wachstum und die Stoffwechselaktivität in lebenden Zellen. Es wird u. a. für den Aufbau der Nucleinsäuren, Phospholipiden und komplexen Kohlenhydraten benötigt (Wagner und Falkner 2001). Über den P-Gehalt kann daher ebenfalls der physiologische Status und die biochemische Zusammensetzung beeinflusst werden. Unter nicht limitierenden Bedingungen beträgt der zelluläre P-Gehalt ca. 1 % der Trockenmasse (Hu 2007). Weitere Faktoren, die Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung der Algenbiomasse bewirken, sind das Alter der Zellen, der pH-Wert, die Temperatur und die Belichtung im Produktionsprozess (Fu et al. 2013, Juneja et al. 2013).

Durchschnittswerte der Gehalte von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Nucleinsäuren für die untersuchten Mikroalgenarten dieser Arbeit befinden sich in Tab. 2.

Tab. 2: Durchschnittliche Zusammensetzung der untersuchten Spezies (bezogen auf die Hauptbestandteile an der Trockenmasse in %) (nach Becker 1994)

Spezies	Proteine	Kohlenhydrate	Lipide	Nukleinsäuren
<i>C. vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22	4–5
<i>S. obliquus</i>	50–56	10–17	12–14	3–6

Neben der Herstellung proteinhaltiger Produkte mit geringem wirtschaftlichem Wert eignen sich Mikroalgen auch zur Erzeugung hochwertiger Stoffwechsel- und Fermentierungsprodukte (Becker 1994). Jedoch ist die wirtschaftliche Nutzung von hochwertigen Mikroalgenprodukten derzeit durch die geringe Ökonomie der Produktionsverfahren auf Grund hoher Betriebskosten, Produktverlusten bei der Aufbereitung und zu geringen Produktionsraten der Zielprodukte begrenzt. Daher werden verschiedene Ansatzpunkte der Mikroalgenproduktion von zahlreichen Forschungsgruppen untersucht, um dabei auch das Verständnis der biochemischen Abläufe in den Zellen zu erweitern. Um den Gewinn entlang der Wertschöpfungskette zu steigern, werden z. B. auch Bioraffineriekonzepte erarbeitet.

2.1.2 Veröffentlichung 1

In der Veröffentlichung 1 „*Use of microalgae as renewable resources*“ (2015. Journal of Central European Green Innovation. 3(3): 149–156) wird der aktuelle Stand zu den Grundlagen von Mikroalgen, ihrer Anwendung in verschiedenen Industriebranchen und zur Produktion in verschiedenen Systemen ausführlich beschrieben

USE OF MICROALGAE AS RENEWABLE RESOURCES

SCHARFF, Claudia

Summary

The commercial production of microalgae started in the early 1950's. Especially in the last two decades, these amounts have tremendously increased. In view of growing world population and limited fossil fuels, microalgae are seen as one promising alternative source for biofuels and high value products (like proteins and ω -3 fatty acids) in different industry branches (e.g. food, feed, cosmetic and pharmaceutic products or waste water treatment). Currently, they are mainly used for food and food supplements. The potential of the small photosynthetic microorganisms for other applications were proven in lab scale experiments. There are obstacles as high processing costs, low production yields and production stability which continue to prevent the commercial use. Furthermore, without artificial lighting and heating, the production in Europe is limited from March to October. As a result, the market prices are often the bottle neck in order to sell products. There is a need for the optimisation of the processes and reactors (e.g. important growth factors, selection of microalgae species and design) to tap the full potential of the green cell factories.

Keywords: microalgae, biomass, sustainable, biofuel

Introduction

Microalgae are described as unicellular or multicellular, photosynthetic organisms with a less complex morphology that occur in sizes from 3 to 80 μm (Abb. 2). Around 40,000 species have been identified but approximately 15 species are used industrially (BERG-NIELSEN 2006). Each year, more than 10,000 tonnes dry matter of microalgae biomass is produced worldwide (SCHULZ 2006). Of this, China accounts for approximately 50 %. Further producing countries are Japan, Taiwan, USA, Israel and Australia.

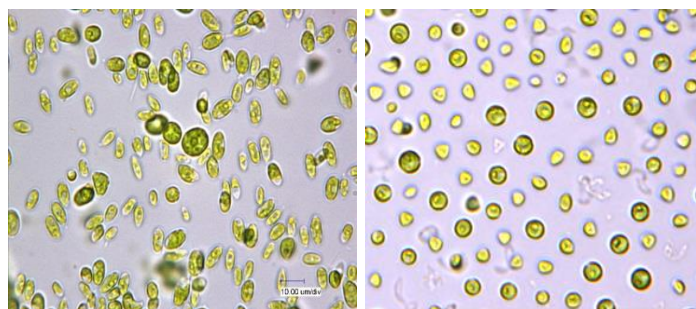


Abb. 2: Microalgae species *Scenedesmus obliquus* (left) and *Chlorella vulgaris* (right) with 2000x magnification (own illustration)

Microalgae have been classified according to the following main criteria: kinds of pigments, the chemical nature of the storage products and of cell wall constituents (TOMASELLI 2007). Additional criteria are cytological and morphological features.

Eukaryotic microalgae were typically classified in Rhodophyta (red algae), Chlorophyta (green algae), Dinophyta, Chrysophyta (golden brown algae), Prymnesiophyta, Bacillariophyta (diatoms), Xanthophyta (yellow-green algae), Eustigmatophyta, Rhabdophyta, Phaephyta (brown algae) (TOMASELLI 2007).

Microalgae have significant advantages, particularly when compared to higher forms of terrestrial plant species as rice or soybeans. These includes no competition for land area with present food crops, a 5 to 10 fold higher growth rate ($30\text{--}550\text{ t ha}^{-1}\text{ a}^{-1}$ compared to soybean $6\text{--}7\text{ t ha}^{-1}\text{ a}^{-1}$) and high oil yields (SOEDER 1971, PULZ 2009, SCHARFF et al., 2013). Beyond that, the cultivation is not tied to typical growing seasons. Because of their chemical composition microalgae can serve to improve the nutritional value of common food preparations and feed (SPOLARE et al. 2006).

Currently, the commercial use is limited by inefficient yields, which are caused by the high level of complexity of the extraction process of sensitive compounds and the high processing costs itself. High expenses are caused by customized nutrition, energy-intensive cultivation (e.g. temperature and light exposure) and preparation of the microalgae like drying and cracking prior to processing.

Cultivation parameters

The growth of algae is determined by many factors, including nutrient composition, pH-value, salt content, carbon availability, temperature and light. With some exceptions the optimum temperature ranges from 20 to 27 °C degrees. Carbon, nitrogen (constituent in proteins and chlorophyll) and phosphor (for transfer of energy and biosynthesis of nucleic acids) are the most important nutrients for microalgae growth. Further composition influencing factors are the salinity and the amount of each macro elements as S, K, Na, Fe, Mg, Ca and of trace elements like Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V and Se (GROBBELAAR 2007).





Light is one of the key factors during the microalgae production (GRIS et al., 2014). Light quantity and quality and the distribution in the cultivation system can alter the microalgae physiology (e.g. metabolism, cell division and growth rate) as well as the biochemical profile of these organisms (BOUTERFAS et al., 2006). Artificial lighting with fluorescent lamps or LED lights enables the possibility for year-round production when conditions regarding the target of microalgae biomass as well as special metabolites are clearly defined. However, cultivation under suboptimal conditions or stress such as nutrient deficiency, light stress or high salinity can increase the production of certain metabolites like lipids and carotenoids (WOLKERS et al., 2011). Depending on their individual demands, microalgae can be cultivated photoautotrophic, (photo-) heterotrophic and mixotrophic.

Microalgae can be produced in open and closed systems (Tab. 3). Open systems can be natural waters (i.e. lakes, lagoons and ponds) or artificial plants like raceway ponds. The typically depth of raceway ponds is about 0.3 m for a good light penetration. The mixing of the culture circulation is commonly performed by a paddlewheel. Advantages of open systems are their inexpensive and simple establishment. Disadvantages are that they are less controllable due changing growth parameters like light, temperature and pH, the fluctuating conditions and dependency on environmental parameters like sun exposure, clouds, precipitation, evaporation and the high contamination risk with other microorganisms (PULZ 2001, MATA et al., 2010). In addition, biomass yields are much lower, when compared to closed systems (in open systems: $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ resp. $10\text{--}25\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$; closed: $3\text{--}15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ resp. $25\text{--}50\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$). The biomass yield of higher oily plants like rape is with $0.8\text{--}1.6\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ much lower as the productivity in open systems. (ROESCH and POSTEN 2012) Nevertheless of the party inefficient operation, 98 % of the generated algae biomass is currently produced in open systems (FAO 2012).

Closed systems have various advantages compared to open systems (Tab. 4). Closed systems allow a controlled process performance by lower contamination risk and higher biomass yields of $35\text{--}40\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ for *Chlorella* (PULZ 2009). To optimize important

growth factors such as light permeability and nutrient absorption, different reactor designs have been developed. These are either tubular, foil bags or flat panel reactors (Tab. 3). High-value products like carotenoids and fatty acids can be prepared with certain purity for industrial applications. Closed systems can be operated with natural sunlight or with artificial light which then directly implies a high energy input (BRENNAN and OWENDE 2010). A higher energy input is also required for the processing of the algae in order to create the desired products.

Tab. 3: Open and closed systems for microalgae production

Open system		Closed systems	
raceway  KYNDT 2010	tubular  SCHROEDER 2011	flat-panel  FRAUNHOFER INSTUTUT 2012	foil-bags  NOVAGREEN 2010
simple construction	optional assembly	thin plastic modules for low light ways	simple, mobile, no cleaning costs

Tab. 4: Comparison of open and closed systems

Parameter	Open system	Closed system
Area requirement	high	low
Water requirement	high	low
Energy demand	low	high
Temperature control	no	required
Cleaning	no	required
Contamination risk	high	low
Product quality	fluctuating	reproducible
Biomass productivity	low	high
Operating costs	low	high

(after ROESCH and POSTEN 2012)

Application of microalgae

Microalgae biomass and its high-value compounds can be used for energetic and material use. It is necessary to ensure the selection of the algae species with regard to the targeted end product, because the different species have distinct characteristic product ranges of metabolites. With a view to limited fossil fuels, microalgae have become a promising feedstock as an alternative source of bioenergy. The total lipid content of microalgae ranges between 1 and 75 %, with average lipid levels between 20–50 % of the cell weight with greater accumulations during stationary phase and under certain conditions (up to 85 % of cell dry weight) (METTING 1996, BECKER 2007, CHISTI 2007, MATA 2010).

The green microalgae species *Botryococcus braunii* is intensive studied as rich natural source for lipids. Stored lipids can be used for the production of biodiesel. The biomass can also be used for the production of biogas. In addition, intensive efforts have been made to produce hydrogen with microalgae (e.g. with *Chlamydomonas reinhardtii*). Particularly in form of using the microalga hydrogenase for the efficient hydrogen production in other cell systems. (MELIS et al., 2007, SCHARFF et al., 2013) However, high market prices limit the commercial use of microalgae biofuels. Concerning this aspect, research is just as necessary as for the above mentioned fields.

At present, microalgae are mainly used as food supplements (about 70 %) and are added in drinks, in candies, bread, pasta etc. (BECKER 2007). Currently, the second focus is the use as animal feed for fish, pets and farm animals (ROSELLO-SASTRE et al. 2010, BECKER 2007). They are also considered to be as highly promising organisms as production organisms for high value bioactive products as proteins, carotenoids, fatty acids and carbohydrates. This can be used in various industrial applications ranging from food, pharmaceutical, and cosmetic to the chemical industry (Tab. 5) (SFORZA et al., 2012, SIMIONATO et al., 2013, GRIS et al., 2014). In this view, that there is a competition between the cheaper synthetic produced pigments and the natural microalgal based ones. The advantage of microalgal pigments is the provision of natural isomers with better physiological properties compared to synthetic products.

Tab. 5: Examples for the application of high value compounds

Cell contents	Samples	Application
Fatty acids	polyunsaturated fatty acids like ω -3-fatty acids (docosahexaen acid, eicosapentaen acid)	<ul style="list-style-type: none"> - food supplements (e.g. in breast-milk substitutes) - pharmaceuticals and cosmetics - feed (e.g. layer, aquaculture)
Carotenoids	astaxanthin, lutein, β -carotene, lycopene	<ul style="list-style-type: none"> - food supplements - food (e.g. margarine , cheese, sausage) - pharmaceuticals and cosmetics - feed
Pigments	chlorophyll, carotenoids	<ul style="list-style-type: none"> - food - pharmaceuticals - feed (e.g. colouring of salmon)
Polysaccharides	β -1,3-glucan, starch	<ul style="list-style-type: none"> - food - cosmetics and pharmaceuticals (e.g. substrate of drugs) - production of bioplastics
And other	iodine, polyphenols, amino acids, proteins, enzymes, antioxidants, toxins, vitamins (A, E, B1, B2, B6, B12, C, K)	<ul style="list-style-type: none"> - food and food supplements - pharmaceuticals and cosmetics (e.g. skin tightening) - feed

(adjusted from PULZ et al., 2004, BEACHAM 2010, FRAUNHOFER INSTUTUT FUER GRENZFLAECHE- UND BIOVERFAHRENSTECHNIK 2010, ROSELLO SASTRE et al., 2010)

Microalgae can also be used as CO₂ storage or to remove pollutants like heavy metals or for the reduction of nitrogen and phosphate from industrial, agricultural and municipal waste waters (HUNT et al., 2009). In addition, microalgae can be used as fertilizers and plant protection compounds, as well as for the production of recombinant proteins. Further concepts for non-terrestrial applications in aerospace are under investigation (PULZ et al., 2004, ROSELLO SASTRE et al., 2010, KIT 2012). As a result of this, microalgae have attracted the attention of various branches of the economy.

Economic state

High processing costs, low production yields and production stability, low space-time yields and high efforts for the preparation of the products are currently major problems for an economic production and the commercialization of the algal technology (SCHARFF et al., 2013). The average market price of microalgae is 36 € per kg dry matter (*Chlorella*) (BRENNAN and OWENDE 2010) and high-value compounds such as astaxanthin (carotenoids) can reach prices of 2000 € per kg and higher (SPOLARE et al. 2006). These high-value compounds make up only a small portion of less than 10 % of the total biomass. (HEJAZI and WIJFFELS, 2004, ROSELLO SASTRE and POSTEN 2010).

Different strategies have been worked out to improve the economic use of microalgal products. This means three main segments: product oriented selection or (genetic) modification of microalgae species (g. higher product yield, increasing photosynthetic efficiency), optimized design (e.g. flat panels, tubes or foil bags) and operating conditions of photobioreactors (e.g. light (wavelength composition, light-dark cycles), nutrition composition, pH, temperature, mixing and pumping strategies of the microalgae broth, air feed etc.) and the development of efficient methods for the preparation of the partly sensitive products.

The development of biorefinery processes will further expand the microalgae usage possibilities along the value chain. This offers the option for an efficient use of every component of the microalgae biomass (Abb. 3). It can be produced simultaneously high-value products, biofuels, animal feed and electrical power. The concepts include the recycling of residues as substrates for the algae culture and the efficient use of exhaust gases and different sources waste waters.

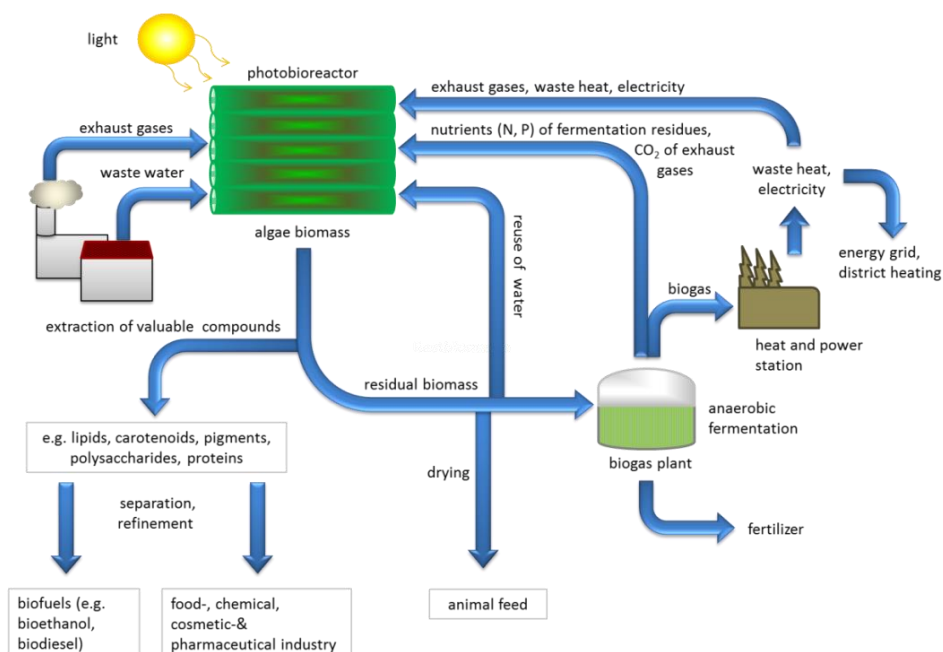


Abb. 3: Microalgae use in biorefinery concept (own illustration)

Outlook

It could be demonstrated that microalgae can be used for versatile applications like the production of bioenergy, high-value compounds, food and food supplements, feeds, in agriculture or pharmaceutical and chemical industry. In view to growing world population, shortage of fertile land, rising demand of food crops and additional limited resources for fuels it will become clear, that alternative and sustainable sources are needed to provide these goods in future for next generations. To exploit the potential of microalgae, further intensive research effort is needed in the direction of optimized growth parameters and operating conditions in order to make microalgae production and processing a competitive renewable resource in the long-term.

REFERENCES

- BEACHAM, W.** [2010] Algae-based bioplastics a fast-growing market. Online available (28.12.2012): www.icis.com/Articles/2010/06/21/9368969/algae-based-bioplastics-a-fast-growing-market.html
- BECKER, W.** [2007] Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology (Hrsg. Richmond, A.). Blackwell Publishing Ltd. pp 312-351
- BERG-NIELSEN, J.** [2006] Production of Microalgae-based Products. Nordic Innovation Centre
- BOUTERFAS, R., BELKOURA, M. and DAUTA, A.** [2006] The effects of irradiance and photoperiod on the growth rates of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica* 25, pp. 647-656.
- BRENNAN, L. and OWENDE, P.** [2010] Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and-co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14(2) pp. 557-577.
- CHISTI, Y.** [2007] Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25. pp 294-306.
- FAO** [2012] Aquatic Biofuels- Open ponds. online available (22.12.2012): www.fao.org/bioenergy/aquaticbiofuels/knowledge/open-ponds/en/
- FRAUNHOFER INSTITUT FUER GRENZFLAECHE- UND BIOVERFAHRENS-TECHNIK.** [2010] Algen Nachhaltige Rohstoffquelle für Wertstoffe und Energie. information brochure
- GRIS, B., MOROSINOTTO, T., GIACOMETTI, G.M., BERTUCCO, A. and SFORZA, E.** [2014] Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in Photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity and biochemical composition. *Appl. Biochem Biotechnol.* 172 pp. 2377-2389.
- GROBBELAAR, J.U.** [2007] Algal Nutrition-Mineral Nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology (Hrsg. Richmond, A.). Blackwell Publishing Ltd. pp. 97-115.
- HEJAZI, M.A. and WIJFFELS, R.H.** [2004] Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 22(4) pp. 189-194.
- HUNT, R.W., ZAVALIN, A., BHATNAGAR, A., CHINNASAMY, S. and DAS, K.C.** [2009] Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 10(10) pp. 4515-4558.

- KIT-KARLSRUHER INSTITUT FUER TECHNOLOGIEN** [2012] Algen begleiten Raumfahrer ins Weltall. press briefing 058. Online available (01.10.2012): www.kit.edu/besuchen/pi_2012_10082.php
- KYNDT, J.** [2010] Algae for waste water treatment and biofuel production: A double winner. Online available (30.12.2012): algaeorbiofuels.com/algae-waste-water-treatment-biofuel-production/
- MATA, T.M., MARTINS, A.A. and CAETANO, N.S.** [2010] Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14(1) pp. 217-232.
- MELIS, A., SEIBERT, M. and GHIRARDI, M.L.** [2007] Hydrogen fuel production by transgenic microalgae.. In: R. Leon, A. Galvan and E. Fernandez (eds.), *Advanced in experimental medicine and biology*, Springer, Vol. 616 pp.110-121.
- METTING Jr. F.B.** [1996]. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17. pp 477-489.
- NOVAGREEN PROJEKTMANAGEMENT GMBH.** [2010] Das Algenmodul. Online available (21.12.2012): www.novagreen-microalgae.com/10.html
- PULZ, O.** [2001] Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(3) pp. 287-293.
- PULZ, O.** [2009] Mikroalgen als Energieträger der Zukunft.. In: T. Bley (eds.), *Biotechnologische Energieumwandlung*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 87-95.
- PULZ, O. and GROSS, W.** [2004] Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(6) pp. 635-648.
- ROSELLO SASTRE, R. and POSTEN, C.** [2010] Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chem-Ing-Tech.* 82(2) pp. 1925-1939.
- ROESCH, C. and POSTEN, C.** [2012] Challenges and Perspectives of Microalgae Production. In: *Technikfolgenabschätzung - Theorie und Praxis* 21. Jg. (eds. Institut für Technikfolgenabschätzung und Systemanalyse), magazine 1
- SCHARFF, C., SCHROEDER, F.-G. and ARNOLD, W.** [2013] The use of high-frequency electromagnetic radiation for an increased productivity of microalgae in closed systems - a concept. *Acta Hort.* 1004 pp. 93-99.
- SPOLARE, P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN E. and ISAMBERT A.** [2006] Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 101 (2). pp 87-96.
- SCHULZ T.** [2006] The economics of micro-algae production and processing into biofuel. Government of Western Australia. Department of Agriculture Western Australia
- SFORZA, E., SIMIMIONATO, D., GIACOMETTI, G.M., BERTUCCO, A. and MOROSINOTTO, T.** [2012] Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS One.* 7(6): e38975.
- SIMIONATO, D., BASSO, S., GIACOMETTI, G.M. and MOROSINOTTO, T.** [2013] Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophys. Chem.* 182 pp. 71-78.
- SOEDER, C.J.** [1971] Mikroalgen im technischen Maßstab. *Biol. Unserer Zeit* 1(5) pp. 133-142.
- TOMASELLI, L.** [2007] The Microalgal Cell. In *Handbook of Microalgal Culture* (ed. Richmond, A), Blackwell Science Ltd

WOLKERS, H., BARBOSA, M., KLEINEGRIS, D.M.M., BOSMA, R. and WIJFFELS, R.H. [2011] Microalgae: the green gold of the future? Large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities. Propress, Wageningen.

AUTHOR

Scharff, Claudia
University of Applied Sciences Dresden
Pillnitzer Platz 2
01326 Dresden
scharff@htw-dresden.de

2.2 Elektromagnetische Strahlung

2.2.1 Einteilung und grundlegende Effekte

Entsprechend der Zielstellung der Arbeit (Kapitel 1.2, S. 2) steht die Behandlung der Mikroalgen mit elektromagnetischer Strahlung im Mittelpunkt. Deshalb soll diese hier näher beschrieben und klassifiziert werden.

Das elektromagnetische Spektrum wird in verschiedene Wellenlängen- bzw. Frequenzbereiche unterteilt (Abb. 4).

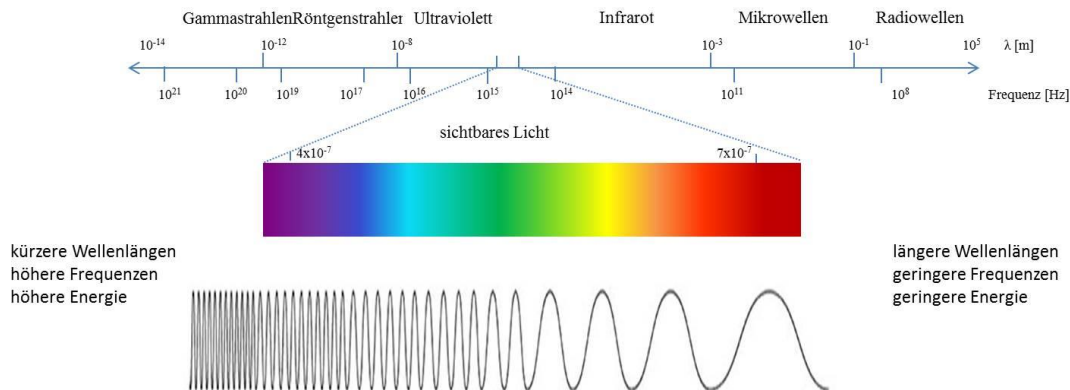


Abb. 4: Einteilung und Erzeugung elektromagnetischer Strahlung

Der Zusammenhang zwischen Energie (E), Frequenz (f) bzw. Wellenlänge (λ) der elektromagnetischen Strahlung wird durch die Formel

$$E = h \cdot f$$

h: Plancksche Wirkungsquantum = $6.626 \cdot 10^{-34}$ Js

f: Frequenz; f ergibt sich aus: $f = \frac{c_v}{\lambda}$

c_v : Ausbreitungsgeschwindigkeit im Medium

λ : Wellenlänge

beschrieben.

In welcher Form eine Wechselwirkung der Strahlung mit Mikroorganismen stattfindet, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Diese können z. B. durch die Zelldichte, den physiologischen Zustand der Zellen, die Medienzusammensetzung sowie durch die Frequenz und Intensität der Bestrahlung beeinflusst werden (Hunt et al. 2009). Zur Induktion verschiedener Effekte, wie z. B. dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung, ist eine sogenannte Aktivierungsenergie notwendig. So kann mit Mikrowellenstrahlung zu wenig Energie in die Atom- oder Molekülstruktur eingebracht werden, um z. B. Atombindungen aufzubrechen (Tab. 6). Daher bezeichnet man diese Strahlung auch als nicht-ionisierend. Durch UV-Strahlung und Röntgenstrahlung (ionisierende Strahlung) ist ein höherer Energiebetrag auf die Zellbestandteile übertragbar. Dadurch können mitunter Schäden u. a. an der DNA auftreten (siehe Kapitel 2.2.4, S. 32).

Tab. 6: Anregungsenergien verschiedener Effekte (nach Ramundo-Orlando 2010)

Physikal.-chemischer Effekt	Frequenz [Hz]	Energie (eV)
Atomisierung	$>10^{15}$	≈ 10
Elektronenanregung	$\approx 10^{15}$	1,5–10
Konformationsveränderung	$\approx 10^{14}$	0,4
Wasserstoffbrückenspaltung	$\approx 10^{13}-10^{15}$	0,08–2
Wärmebewegung	$\approx 5 \cdot 10^{12}$	0,026

Die Auswirkungen verschiedener Wellenlängenbereiche des elektromagnetischen Spektrums auf biologische Systeme wie z. B. Bakterien, Hefen, Algen, Saatgut und Pflanzen wurden in zahlreichen Studien untersucht (u. a. Grundler et al. 1977, Betskii et al. 2007, Gromozova et al. 2011, Raha et al. 2011). Verschiedene Effekte bzw. Angriffspunkte elektromagnetischer Strahlung sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Potentielle Angriffspunkte und Effekte an einer Zelle durch elektromagnetische Strahlung (nach Hunt et al. 2009 und Ramundo-Orlando 2010)

Angriffspunkt	Effekte
Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> - Erhöhung der Membranpermeabilität - erhöhte Zirkulation und selektive Verstärkung des Ionentransportes (z. B. Akkumulation von Spurenmetallen) - Veränderung der Verteilung von Protein-Lipiddomänen und Konformationsänderungen in Lipid-Proteinverbindungen - Veränderung der internen Verteilung elektrischer Ladungen in Lipiden in der Membrandoppelschicht
Chloroplast	<ul style="list-style-type: none"> - Einfluss auf Pigmentmenge (u. a. Chlorophyll, Phycocyanin und β-Carotin) - Veränderung der Photosyntheseaktivität und -effektivität
Zellkern	<ul style="list-style-type: none"> - Aktivierung der spezifischen Genexpression - Veränderungen in der DNA-Konformation
Gesamte Zelle	<ul style="list-style-type: none"> - Interaktion mit benachbarten Zellen (Zell-zu-Zelle Kommunikation) - Sekretion von Signalmolekülen - Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) - veränderte Enzymaktivität

Ein Problem bei der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse stellen dabei die biologische Komplexität und die geringe Reproduzierbarkeit durch z. T. fehlende Angaben in den Veröffentlichungen, aber auch durch hohe Abweichungen zwischen den Versuchsergebnisse dar (Hunt et al. 2009, Ramundo-Orlando 2010). Eine klar definierte Abgrenzung zwischen dem verursachenden Strahlungsbereich und dem beobachteten Effekt ist daher nicht einfach möglich. Teilweise werden auch erst durch sekundäre Effekte, wie z. B. durch Auslösung von oxidativem Stress oder induzierter verkürzter Generationszeit, metabolische Veränderungen verursacht. In den folgenden Abschnitten erfolgt daher eine ausführliche Betrachtung der Wechselwirkung zwischen bestimmten Bereichen des elektromagnetischen Spektrums und der biologischen Zelle.

2.2.2 Sichtbares Licht

Als sichtbares Licht bezeichnet man den Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums von 380 bis 780 nm. Innerhalb dieses Rahmens befindet sich der Bereich der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) von 400 bis 700 nm. Licht als Energiequelle stellt den wichtigsten Umweltfaktor für alle Photosynthese betreibenden Organismen dar, um organische Verbindungen zu produzieren (Jahns und Holzwarth 2012, Carvalho et al. 2011). Daher ist dieser Faktor nach Behrens (2005) auch der wichtigste Parameter, der beim Design und der Konstruktion eines Photobioreaktors berücksichtigt werden muss.

Licht kann sowohl durch Wellen- (z. B. Interferenz) als auch Teilcheneigenschaften (Masse eines Lichtquants) beschrieben werden. Die kleinsten absorbierbaren Einheiten der Strahlung werden als Photonen oder Quanten bezeichnet. Jedes Photon besitzt einen diskreten Anteil Energie. Die Energie eines Photons ergibt sich entsprechend der im Kapitel 2.2.1 (S. 15) beschriebenen Formel:

$$E = h \cdot f \text{ und } f = \frac{c_v}{\lambda}$$

c_v : Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht im Vakuum = $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

λ : Wellenlänge des Photons.

Daraus ergibt sich, dass die Energie des eingestrahlteten Lichtes umgekehrt proportional zur Wellenlänge ist und kürzere Wellenlängen einen höheren Energiegehalt und längere Wellenlängen weniger Energie pro Photon besitzen.

Lichtquellen

Bei der phototropen Kultivierung von Mikroalgen stellt Licht einen limitierenden Faktor dar. Dabei kann Licht durch die Sonne oder mittels Kunstlicht durch z. B. Leuchtstoffröhren (FL), Hochdruck-Gasentladungslampen (HID) oder Leuchtdioden (LED) bereitgestellt werden. Sonnenlicht stellt dabei die kostengünstigste Lichtquelle dar, jedoch verursachen Faktoren wie Fluktuationen, Wolken oder saisonale Unterschiede schwankende Bedingungen. Zudem ist das Lichtspektrum unspezifisch und nicht abstimmbar. Der Wirkungsgrad für die Umwandlung der Sonnenenergie in Biomasse entspricht maximal 3 % (Benemann 2007).

Kunstlicht kann durch interne und externe Lichtquellen in den Photobioreaktor eingebracht werden. Interne Strahlungsquellen wie z. B. Tauchstrahler kommen direkt mit der zu belichtenden Kultur in Kontakt. Bei einer externen Belichtung werden energiereiche Strahler benötigt, um je nach Charakteristik des Kultivierungskolbens, durch die Bauform und Materialeigenschaften, und der Suspension (z. B. Zelldichte) eine hohe Eindringtiefe zu gewährleisten. Das eintreffende Licht externer Strahler nimmt im Inneren wegen der Absorption und der Streuung durch die Zellen exponentiell ab. Die Schwächung der Strahlung mit zunehmender Eindringtiefe wird mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz angenähert beschrieben.

Lambert-Beer'sche Gesetz: $E_{\lambda} = -\ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = c \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot l$

E_{λ} : Wellenlängenabhängige Extinktion

I_1 : Intensität des transmittierten Lichts

I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

c : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

ε : Extinktionskoeffizient (oft auch als spektraler Absorptionskoeffizient bezeichnet) bei der Wellenlänge λ

l : Dicke des durchstrahlten Körpers

Ein Problem künstlicher Belichtung ist, dass das Licht mit steigender Zellzahl verstärkt durch die Pigmente (z. B. Chlorophyll), Zellfragmente und Medienbestandteile absorbiert wird und die Lichtintensität mit der Eindringtiefe abnimmt. Die dadurch entstehenden Hell-Dunkelzonen im Kultivierungssystem können den Kultivierungsablauf beeinflussen. Daher sind eine geeignete Zirkulation und/oder kurze Lichtwege für eine optimale Belichtung neben dem Gasaustausch, der Temperatur- und pH-Kontrolle notwendig (Behrens 2005).

Die Verwendung von Kunstlicht ermöglicht die Produktion unter definierbaren und zeitlich stabilen Lichtbedingungen (Blanken et al. 2013). Dadurch können entsprechende Prozesse und damit der Anteil von z. B. Pigmenten, Fettsäuren und Kohlenhydraten gesteuert werden (Renaud et al. 1991, Kula et al. 2014, Scharff et al. 2017a).

Lichteinflussgrößen

Der Faktor Licht umfasst vier determinierende Faktoren, die das Algenwachstum und die Stoffwechselaktivität beeinflussen: die Lichtintensität und spektrale Zusammensetzung, die Tag-Nachtdauer und die Pulsdauer (Abb. 5) (Kula et al. 2014). Diese werden im Folgenden Abschnitt weiter erklärt.

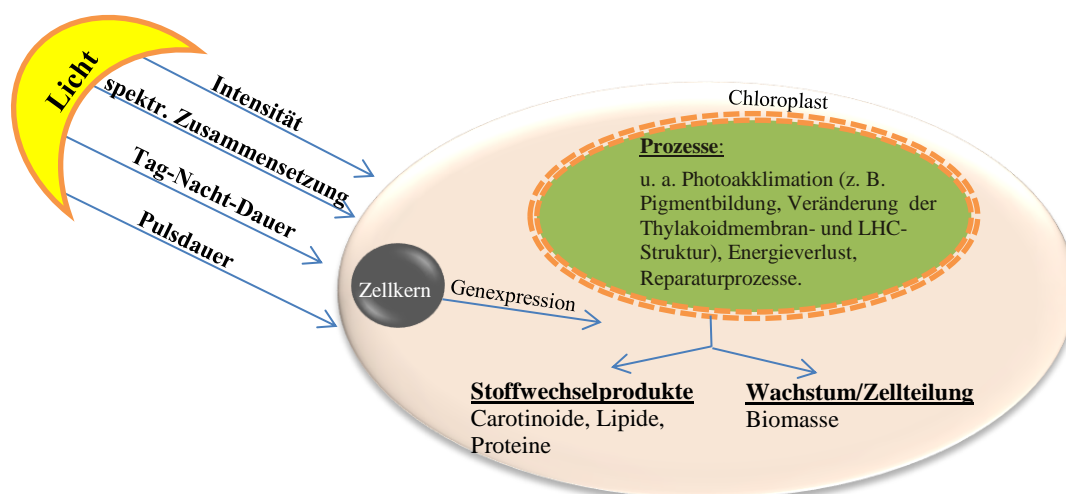


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Lichteinflussgrößen an einer Mikroalgenzelle (nach Barra et al. 2014)

Lichtintensität

Die Lichtintensität wird unter anderem als Photonenflussdichte (PFD) in $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angegeben und stellt dabei die gemittelte Lichtintensität über den PAR-Bereich von 400–700 nm dar. Die PFD entspricht dabei der Anzahl der Photonen pro Fläche und Zeit. Da jedoch damit keine Angaben über den Energiegehalt der Strahlung möglich sind, ist die zusätzliche Angabe bzw. die Messung des Spektrums der verwendeten Lichtquelle zur Vergleichbarkeit von Studien notwendig.

Die Lichtintensität beeinflusst u. a. die Photosyntheserate. In sogenannten Sättigungskurven wird diese Abhängigkeit dargestellt (Anhang A 1, S. 149) und kann je nach Spezies und Umweltbedingungen variieren. Dabei wird die Abhängigkeit Photosyntheseleistung von der Lichtintensität dargestellt. Die Sättigungskurve beginnt im negativen Bereich, da bei geringer Lichtintensität die Zellen atmen und damit Sauerstoff verbraucht wird. Solange keine anderen Umweltfaktoren (z. B. CO_2 oder andere Nährstoffe) limitierend wirken, steigt die Photosyntheserate mit Erhöhung der Lichtintensität proportional. Am Lichtkompensationspunkt ist die O_2 -Abgabe (bzw. CO_2 -Aufnahme) durch die Photosynthese genauso so groß wie der O_2 -Verbrauch (bzw. CO_2 -Produktion). Die Kurve der Photosyntheseleistung steigt mit zunehmender Lichtintensität immer weniger bis zu dem Punkt, an dem sich trotz steigender Lichtintensität die Photosyntheseleistung nicht mehr erhöht. An diesem Punkt ist die Lichtsättigung erreicht. Die Energie überschüssiger Photonen wird vor allem als Wärmedissipation abgegeben. Hohe Lichtintensitäten über dem Lichtsättigungspunkt können aber auch eine Reduzierung der photosynthetischen Effizienz bewirken und wird als Photoinhibierung bezeichnet. Dies beschreibt eine Reaktion in den Zellen, die innerhalb von Minuten stattfindet. Dabei wird u. a. das D1-Protein des Photosystem II (PS II) verändert und damit die Quantenausbeute herabgesetzt, die Chloroplastenmembran beschädigt oder Enzymaktivitäten zur CO_2 -Fixierung reduziert (Juneja et al. 2013). Wenn die überschüssige Energie nicht mehr abgeführt werden kann, kann es auch zur Bildung von O_2 -Radikalen kommen, die das Photosystem schädigen können.

Neben dem Wachstum kann die Lichtintensität auch die biochemische Zusammensetzung, wie z. B. die Pigmentanteile verändern, um sich an die veränderten Umweltbedingungen anzupassen (Chrismadha und Borowitzka 1994). Dies wird auch Photoakklimation bezeichnet. Dieser Prozess ist eine Reaktion, die mehrere Tage dauern kann (Nikolaou et al. 2016).

Spektrale Zusammensetzung des Lichtes

Die Absorption verschiedener Spektralbereiche des Lichtes wird durch Pigmente wie Chlorophyll a und b (Chl a und Chl b), β -Carotin und Lutein in den Lichtsammelkomplexen (LHC) und Reaktionszentren der Photosysteme I (PS I) und II in der Thylakoidmembran, aber auch durch z. B. eingelagerte Carotinoide in Lipidkörperchen ermöglicht. Für die Photosynthese wird hauptsächlich Licht in den Wellenlängenbereichen zwischen 400–500 nm, sowie 600–700 nm benötigt, da in diesem Bereich die maximale Absorption der beteiligten Pigmente stattfindet (Chl a: 430/660 nm, Chl b: 450/640 nm; Carotinoide: 440–550 nm) (Pilon et al. 2011).

Auf Grund der spezifischen Chlorophyll-Proteinkomplexe im PS I und PS II ergibt sich für die Photosysteme ein Absorptionsmaximum von 700 nm (PS I) und 680 nm (PS II). Wie viele Photonen absorbiert werden können, hängt u. a. von der Thylakoiddichte und der Pigmentzusammensetzung im LHC ab, die wiederum zur Anpassung an die Lichtbedingungen verändert werden können (Seyfabadi et al 2011, Croce und Amerongen 2013, Garcia-Camacho et al. 2012, Nikolaou et al. 2016).

Lichtquellen in Form von LED mit einem schmalbandigen Spektralbereich stellen eine Möglichkeit dar, um wellenlängenabhängige Effekte zu untersuchen und die spektrale Zusammensetzung entsprechend anzupassen. So kann Rotlicht zu einer erhöhten Zellzahl und kleineren Zellgrößen führen, während Blaulicht zu größeren Zellvolumina und eine inhibierten Zellteilung bewirken kann. Das Verhältnis von rotem zu blauem Licht kann zudem Stoffwechselprozesse, wie z. B. Enzymaktivitäten und die Genexpression beeinflussen. (Lee und Palsson 1996, Das et al. 2011, Kim et al. 2014) Obwohl grünes Licht nicht im Absorptionsbereich der Pigmente liegt, konnten ebenfalls Effekte auf die Pigmentierung in *C. vulgaris* nachgewiesen werden (Mohsenpour und Willoughby 2013). Nach Schulze et al. (2014) wird das Absorptionsspektrum der Zellen jedoch durch die Beteiligung aller zellulärer Bestandteile, die in der Lage sind Licht zu absorbieren oder zu streuen, definiert. Die tatsächlichen Anforderungen an die spektrale Zusammensetzung für Zellteilungs- und Stoffwechselprozesse werden somit von mehreren Faktoren komplex beeinflusst und sind spezies-spezifisch. Eine umfassende Übersicht zu nachgewiesenen Effekten verschiedener Wellenlängen auf die Stoffwechselprozesse in Mikroalgen befindet sich in Schulze et al. (2014).

Tag-Nacht-Dauer

In natürlicher Umgebung sind die Lichtintensität, die spektrale Zusammensetzung und die Tageslänge charakteristisch für die Herkunft einer Spezies. Mikroalgen besitzen evolutionsbedingt daher einen zirkadianen Rhythmus, der den Zellen eine Abschätzung der Umgebungszeit ermöglicht (de Winter et al. 2014, 2017). Der zirkadiane Rhythmus beeinflusst u. a. die Photosynthese, die Respiration, die Zellteilung und Wachstumsraten (Bouterfas et al. 2006). Die unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten über den Tag, wie den Aufbau energiereicher Verbindungen über den Tag und die Nutzung dieser für die Proteinbiosynthese in der Nacht, führen dazu, dass die biochemische Zusammensetzung der Zellen über den Tag schwankt. Diese Prozesse können aber speziesabhängig sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. (Cuhel et al. 1984, Edmundson und Huesemann 2015) Durch diese innere Uhr können Zellprozesse in verschiedene Tagesabschnitte gelagert werden. UV-sensitive Prozesse, wie die DNA-Replikation, erfolgen daher in der Nacht (Nikaido und Johnson 2000). Auch die Zellteilung erfolgt häufig in der Nacht, während das Zellvolumen in der Tagphase steigt (Matsuo und Ishiura 2010, de Winter et al. 2017). Die Biomasse kann im Tagesverlauf ebenfalls schwanken, sodass maximale Werte während der Tagphase und eine geringere Biomasse während der Nacht bestimmt werden (Edmundson und Huesemann 2015). Eine Veränderung des natürlichen Tag-Nachtzyklus kann das Gleichgewicht dieser rhythmischen Prozesse stören. Dies kann zur Auslösung von Stress in den Zellen und unerwünschten Effekten, wie z. B. der Zystenbildung, führen (Fogg 2001, Lorenz et al. 2005).

Nach Untersuchungen von de Winter et al. (2014, 2017) ist der innere Rhythmus der Zellen auch zur Bestimmung eines gezielten Erntezeitpunktes für spezifische Produkte aus Algen nutzbar.

Pulsdauer

Der Abstand der Hell-Dunkelzyklen (Pulsdauer), insbesondere bei hohen Lichtintensitäten, kann einen positiven Effekt auf die Lichtausnutzung und damit auch auf Wachstumsprozesse bewirken. Dadurch kann die Photosyntheserate erhöht werden. Dieser Effekt wird „flashing light effect“ genannt und bezeichnet eine weitere Möglichkeit der Manipulation der Lichtverfügbarkeit. Nach Chmiel (2006) und Béchet et al. (2013) gilt eine maximale Frequenz des intermittierenden Lichts von 10 Hz, damit dieser Effekt wirksam werden kann. Dies beruht auf der Feststellung, dass der Photosyntheseapparat ca. 100 ms benötigt, um die Lichtquanten in chemische Energie umzuwandeln (Grobelaar et al. 1992, Luo und Al-Dahhan 2004).

2.2.3 Mikrowellenstrahlung

2.2.3.1 Grundlagen zu Mikrowelleneffekten

Als Mikrowellen bezeichnet man elektromagnetische Wellen in einem Frequenzbereich von 300 MHz–300 GHz (λ : 1 m–1 mm). Verschiedene Anwendungsbereiche der Mikrowellentechnik erfolgen bei zugeteilten Frequenzbereichen. So werden für Mobiltelefone Frequenzen bei 824–850, 900, 1800 oder 1900 MHz, für Mikrowellenherde 915 und 2450 MHz oder für Straßenradarsysteme Frequenzen zwischen 10,5 und 24 GHz eingesetzt (Janković et al. 2014). Frequenzen über 30 GHz finden z. B. in der Radarnutzung Anwendung. Wie bei jeder elektromagnetischen Strahlung finden bei der Wechselwirkung mit der auftreffenden Materie physikalische Erscheinungen wie Reflexion, Absorption und Brechung statt. Die Nutzung elektromagnetischer Strahlung in Form von Mikrowellen zur Behandlung biologischer Systeme, wie z. B. von Pflanzen, Bakterien und Pilzen, wird bereits seit den 1960ern untersucht (Webb und Booth 1969, Morozov et al. 2013). Wesentliche Untersuchungen ab den 1980er Jahren erfolgten in den USA und Staaten der früheren Sowjetunion unter militärischen und medizinischen Aspekten. Diese Literatur ist zum Teil nicht zugänglich (Pakhomov et al. 1998).

Bei der Bestrahlung biologischer Materie mit Mikrowellen können thermische und nicht-thermische Effekte auftreten. Thermische Effekte entstehen durch die Absorption der Mikrowellenstrahlung von Zellen bzw. Zellbestandteilen. Dabei werden Moleküle wie Proteine, DNA oder Wasser in Schwingungen versetzt, wodurch Wärme entsteht. Die Absorption der Strahlung hängt u. a. von den dielektrischen und geometrischen Eigenschaften der Moleküle ab. Dieser Effekt wird z. B. zur Desinfizierung oder Sterilisierung von Oberflächen und Flüssigkeiten oder zum Erhitzen von Lebensmitteln genutzt. (Janković et al. 2014) Die thermische Wechselwirkung wird auch zum Zellaufbruch zur Gewinnung von Fetten und Ölen und zur Produktion von Biodiesel aus Mikroalgen untersucht (Lee et al. 2010, Mercer und Armenta 2011, Balasubramanian et al. 2011, Koberg et al. 2011). Dabei werden die Zellen durch die Mikrowellenbestrahlung u. a. kurzzeitig hohen Temperaturen ($> 100^{\circ}\text{C}$) ausgesetzt. Die Reaktion auf die Bestrahlung zeigte sich in

den Untersuchungen sehr spezies-spezifisch und unterschiedlich effektiv. Untersuchungen von Lee et al. (2010) konnten zeigen, dass durch die Extraktion unter Nutzung von Mikrowellenstrahlung im Vergleich zu weiteren Aufschlussmethoden der höchste Gehalt von Lipiden aus *C. vulgaris* und *Botryococcus braunii* extrahiert werden konnte. Untersuchungen von Balasubramanian et al. (2011) konnten mittels der mikrowellenunterstützten Extraktion eine 20-fache Reduktion der Prozessdauer und eine bessere Qualität des extrahierten Öls nachweisen. Auf Grund der schwankenden Stabilität der erhaltenen Produkte, müssen diese Prozesse nach Koberg et al. (2011) weiter optimiert werden. Koberg et al. (2011) zeigten in ihren Untersuchungen, dass durch die Anwendung der Mikrowellentechnik ein einstufiges Verfahren zur Produktion von Biodiesel durch die direkte Umwandlung des extrahierten Öls aus den Algenzellen zu höheren Biodieselerträgen führt. Für die meisten Untersuchungen wird eine Arbeitsfrequenz von 2,45 GHz verwendet, da hierfür kommerziell verfügbare, sichere Quellen erhältlich sind. Die Nutzung der Mikrowellentechnik zur Behandlung von Mikroalgen befindet sich jedoch noch im Labormaßstab. Zur Gewinnung von sensitiven Inhaltsstoffen ist diese Methode auf Grund der Temperaturentwicklung derzeit nicht geeignet.

Nicht-thermische Effekte wurden bei sehr hohen Frequenzen (extremely high frequency = EHF, 30–300 GHz) im Millimeterbereich beobachtet. Die Ursache dieser Effekte konnte bisher nicht vollständig geklärt werden (Janković et al. 2014). Nach Ergebnissen von Sato (2001 in Banik et al. 2003) können durch die Mikrowellenanregung Ionen beschleunigt werden, welche mit anderen Molekülen zusammenstoßen. Andererseits können Dipole mit einer hohen Rotationszahl verursacht werden, welche zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen führen können. Nach Pakhomov et al. (1998) ist die Zellmembran der wichtigste Angriffspunkt von Mikrowellenstrahlung im Millimeterbereich. Durch die Bestrahlung von Wasser mit Mikrowellen in diesem Wellenlängenbereich können freie Radikale wie Hydroxylradikale (OH^{\bullet}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen. Diese können u. a. eine Lipidperoxidation verursachen, die zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembranen führt und damit ein veränderter Ionentransport möglich ist (Pakhomov et al. 1998, Betskii et al. 2007). Verschiedene Experimente haben nach Betskii et al. (2007) gezeigt, dass bereits eine einmalige Behandlung mit geringen Energieeinträgen Effekte wie eine erhöhte Wachstumsrate, ein um das 2–2,5-fach erhöhter Biotrockenmasseertrag und auch eine erhöhte Sekretion von organischen Verbindungen in das umgebende Medium verursachen kann. Der Sauerstoffgehalt soll dabei eine entscheidende Rolle für die weitere Umwandlung und Speicherung von Radikalen und für die Entwicklung von autokatalytischen Reaktionen spielen. Die Wirkung von H_2O_2 als ein starker Elektronenakzeptor, beurteilen die Autoren als wichtige Ursache für nicht-thermische Effekte von Mikrowellenstrahlung im Millimeterbereich. Die Anwesenheit von Peroxiden kann Photosyntheseprozesse in Verbindung mit einer Pigmenteinlagerung intensivieren. Untersuchungen aus Israel, Russland und der Ukraine haben ebenfalls gezeigt, dass die Bildung von zusätzlichem Radikalen und Peroxidgruppen eine Stimulation des Zellmetabolismus wie z. B. eine beschleunigte Adenosintriphosphat-Synthese (ATP) zur Folge haben kann. Dies führte zu einer verstärkten Biotrockenmassebildung wie z. B. bei *Halobacterium salinarium* (Slavin 2009). Auch veränderte Enzymaktivitäten können durch Mikrowellenbestrahlung induziert werden (Ramundo-Orlando 2010).

Tambiev und Skalny (2012) beschreiben die biologischen Effekte durch Mikrowellenstrahlung im Millimeterbereich als kumulativ. Aus eigenen Versuchen mit Mikroalgen und Cyanobakterien konnte durch die Autoren nachgewiesen werden, dass die biochemische Zusammensetzung von photosynthetischen Zellen beeinflusst wird. Bei Versuchen mit den Cyanobakterienarten *Spirulina platensis* und *Spirulina maxima* konnte durch die Mikrowellenbestrahlung bei einer Frequenz von 35,94 GHz eine verstärkte Akkumulation verschiedener Spurenelemente aus der Umgebung wie Selen, Chrom, Zink, Kupfer nachgewiesen werden. Dadurch entstand eine erhebliche Veränderung der Elementarzusammensetzung der Zellen. Weiterhin beschreiben die Autoren, dass durch die konvektive Durchmischung der bestrahlten Flüssigkeit der Transport von Ionen, Wasser und verschiedenen Substanzen durch die Biomembran erhöht werden kann. Diese Effekte waren jedoch stark frequenzabhängig. Nach den Autoren können die biologischen Effekte nur detektiert werden, wenn die Resonanzfrequenz der bestrahlten Objekte erreicht wurde. Jedoch können diese Effekte bereits bei kleinsten Abweichungen von 100–200 MHz von der Resonanzfrequenz verschwinden. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass mit zunehmendem Alter der Kulturen oxidative Verbindungen in das umgebende Medium sekretiert werden und dieser Effekt durch die Mikrowellenbestrahlung verstärkt wurde.

Morozov et al. (2013) beschreiben in ihrem Review, dass bei nicht-thermischen Effekten einer Mikrowellenbehandlung die Frequenz als Träger einer Information dient. Die Effektivität dieser Strahlung hängt nach den Autoren dabei nicht von der Intensität ab. Die biologische aktive Frequenz der bestrahlten Objekte entspricht der Resonanzfrequenz und kann sich während der Behandlung z. B. durch einen veränderten Wassergehalt verändern. Ausgehend von ihren Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, dass verschiedene Frequenzen in Form einer 2-Frequenzstrahlung genutzt werden müssen, um die positiven Effekte durch Mikrowellenstrahlung zu bewirken.

Nach Betskii et al. (2007) kann die Behandlung von biologischen Objekten mit elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich eine sichere, umweltfreundliche Methode in der Photobiotechnologie darstellen. Daher sind weitere Forschungsarbeiten auf diesem Sektor notwendig, um das Potential dieser Behandlungsmöglichkeit besser ausschöpfen zu können.

Weitere Grundlagen zur Behandlung von Mikroalgen mit Mikrowellen befinden sich in der Veröffentlichung 2 im folgenden Kapitel 2.2.3.2. Im Kapitel 4.4 (S. 79) werden darauf aufbauende Versuche und die Ergebnisse vorgestellt.

2.2.3.2 Veröffentlichung 2

In der Veröffentlichung 2 „*The Use of High-Frequency Electromagnetic Radiation for an Increased Productivity of Microalgae in Closed Systems- a concept*“ (2013, Acta Horticulturae. 1004: 93–99.) erfolgt eine theoretische Betrachtung zur Nutzung hochfrequenter Bereiche elektromagnetischer Strahlung auf biologische Systeme. Darauf aufbauend wurde ein Konzept zur Behandlung von Mikroalgen in Zellkulturflaschen erarbeitet und vorgestellt.

The Use of High-Frequency Electromagnetic Radiation for an Increased Productivity of Microalgae in Closed Systems - a Concept

C. Scharff^{1,a}, F.-G. Schroeder¹ and W. Arnold²

¹University of Applied Sciences Dresden, Faculty for Agriculture/Landscape Management, 01326 Dresden, Germany; ²AFT microwave GmbH, 71522 Backnang-Waldrems, Germany

^ascharff@htw-dresden.de

Abstract

The versatile use of biomass and specific products from microalgae make them attractive for several applications in industry and economy. However, a commercial use of advanced systems is limited by the efficiency of product yields, extraction of sensitive products and high costs during processing. High expenses are caused by nutrients, energy-intensive cultivation (defined temperature and light regime) and preparation of the microalgae like drying and cracking of the cell wall. With these problems in mind, different researchers are working on methods to optimize the systems to make microalgae based applications economically usable. The focus of the presented concept is to enhance the biosynthesis of several metabolites as well as the growth rate by a high-frequency electromagnetic radiation treatment. At the same time the risk of contamination in the photobioreactors is reduced. We show, that high frequency electromagnetic fields can be used for small biological systems to stimulate various processes in the cells.

Keywords: green algae, microwave treatment, growth rate, stress, photobioreactor

Scharff C., Schroeder F.-G. and Arnold W. 2013. The use of high-frequency electromagnetic radiation for an increased productivity of microalgae in closed systems-a concept. *Acta horticulturae*. 1004: 93–99.

doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1004.9

2.2.4 UV-Strahlung

Unter UV-Licht versteht man Strahlung im Spektralbereich von 200 bis 380 nm und wird unterteilt in UV-A- (320–380 nm), UV-B- (280–320 nm) und UV-C-Licht (200–280 nm).

In phototrophen Organismen, wie Mikroalgen, stellt die Photosynthese eines der hauptsensitiven physiologischen Ziele von UV-Strahlung dar (Vass et al. 2005, Hideg et al. 2013). Prinzipiell kann UV-Strahlung zu vermehrter Bildung von ROS durch einen Verlust von Elektronen von molekularem Sauerstoff bei der Elektronentransportaktivität an den Chloroplasten, Mitochondrien und der Plasmamembran führen (Pessoa 2012, Mallick und Mohn 2000). ROS, wie z. B. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hyperoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), H_2O_2 und OH^{\cdot} , können in der Folge mit Biomolekülen reagieren und deren biochemische Aktivität verändern (He und Häder 2002, Vincent und Neale 2000). Dabei können die kurzwelligeren UV-B-Strahlen im Vergleich zu UV-A-Strahlen die DNA in höherem Maße und direkt schädigen, mehr oxidativen Stress verursachen und die verstärkte Expressierung der für die Apoptose verantwortlichen Gene induzieren (Pessoa 2012). Aber auch UV-A Strahlung kann die DNA indirekt durch die Bildung von Zwischenprodukten wie Sauerstoff- und Hydroxylradikalen schädigen.

UV-Strahlung kann eine Reduktion der Reaktionszentren von PS II induzieren, die Aktivität des Enzymes Ribulose-1,5-Bisphosphatase-Carboxylase-Oxygenase (RuBisCO) inaktivieren, die Abnahme oder Zunahme des Gehaltes an Chlorophyll und Carotinoiden regulieren und die Transkription von Photosynthesegenen und die Struktur von Chloroplasten beeinflussen. Der PS I-Komplex ist dabei unempfindlicher gegenüber Stressoren als das PS II (Strid et al. 1990). Eine spezifische Reaktion auf UV-B-Strahlung ist der schnelle lichtbetriebene Abbau der strukturell und funktionell ähnlichen Proteine D1 und D2, die den Kern des PS II formen. Dieser Prozess kann nicht durch UV-A Strahlung induziert werden. Der Abbauprozess erfolgt bei einer Bestrahlung mit einer maximalen Wellenlänge von 300 nm. Die PS II-Inaktivierung wird bei kürzeren UV-C Wellenlängen beschleunigt. Die Akkumulation von inaktiven PS II lässt sich anhand der Abnahme der Sauerstoffproduktion und variabler Chlorophyllfluoreszenz messen. (Jansen et al. 1998)

Mikroalgen haben verschiedene Strategien entwickelt, um sich an UV-Strahlung anzupassen und eine Schädigung durch UV-Licht zu reduzieren bzw. Schäden zu reparieren (Häder et al. 2011). Eine Möglichkeit dafür ist die Produktion und Akkumulation von UV-absorbierenden Verbindungen wie z. B. Mycosporin-ähnlichen Aminosäuren (MAA), Flavonoiden und Carotinoiden (Sinha et al. 1998, Navarro et al. 2007, Rastogi und Incharoensakdi 2014). MAAs können UV-A und UV-B Strahlung zwischen 309 und 362 nm absorbieren und durch UV-Strahlung eingetragene Wärme ableiten. Sie weisen eine hohe Photostabilität und Resistenz gegenüber verschiedenen abiotischen Umweltfaktoren aus. (Häder et al. 2011, Rastogi und Incharoensakdi 2014) Carotinoide können zum einen wie MAAs ein Teil der UV-Strahlung absorbieren und sie können zusammen mit nicht-enzymatischen Verbindungen und Enzymen als Antioxidantien fungieren (Mallick und Mohn 2000).

Antioxidative Verbindungen sind in der Lage, die z. B. durch UV-Strahlung vermehrt gebildeten Oxidantien (freie Radikale oder ROS) zu neutralisieren und so oxidativen Stress (Ungleichgewicht von freien Radikalen und antioxidativen Substanzen) zu verhindern (Kondo und Kawashima 2000). Dadurch werden sensitive Zellbestandteile, wie Membranlipide, ungesättigte Fettsäuren, Proteine und Nukleinsäuren, geschützt. Wenn die Akkumulation von ROS die antioxidative Kapazität der Verbindungen übertrifft, können der Photosyntheseapparat und anderen Zellbestandteile geschädigt werden. Dies kann zu verminderten Wachstumsraten und schließlich bis zum Zelltod führen. Moderate UV-A Dosen im Bereich von $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ können aber auch die Photosynthese stimulieren und dem negativen Effekt der UV-B Strahlung entgegenwirken (Xu und Gao 2010).

Weiterhin besitzen Organismen verschiedene Reparaturmechanismen, um z. B. Schäden an der DNA oder dem Photosyntheseapparat zu reparieren. So kann die DNA-Reparatur durch Exzisionsreparatur und Photoreaktivierung erfolgen. Bei der Photoreaktivierung können bei der Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich von 300–500 nm Thymidin-Dimere wieder zu Thymidin-Monomere durch das Enzym Photolyase gespalten werden. Dadurch können Schäden durch UV-B-Strahlung durch die Bestrahlung mit UV-A bzw. VIS-Strahlung repariert werden. Durch UV-Strahlung defekte bzw. zerstörte Proteine können abgebaut und neu gebildet werden (Häder 2000).

3 Material und Methoden

3.1 Mikroalgenstämme

Im Rahmen der Untersuchung wurden zwei Mikroalgenarten aus der Abteilung Chlorophyta ausgewählt und von einer internen Stammalgenbank der GMBU e.V. Halle für die Untersuchungen bereitgestellt. Die Auswahl erfolgte auf Grund ihrer leichten Kultivierbarkeit sowie ihrer intensiven Nutzung als Modellorganismen von weiteren Forschungsgruppen (Piorreck et al. 1994, Kula et al. 2014). Dadurch kann auf eine entsprechende Literaturgrundlage zurückgegriffen werden.

3.1.1 *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris ist eine eukaryotische, süßwasserliebende Mikroalge, die kugelige, 3–11 µm große Einzelzellen aufweist (Abb. 6).



Abb. 6: Schematische Darstellung des Zellaufbaus von *C. vulgaris* (links, Vogel 2011); lichtmikroskopische Aufnahme (rechts, 2000-fache Vergrößerung, Keyence VHX100, eigene Aufnahme)

Die weitere Systematik zur Klassifizierung ist wie folgt (nach Ecke 2004a, Guiry 2015):

- Wissenschaftlicher Name: *Chlorella vulgaris* Beijerinck
- Abteilung: Chlorophyta
- Klasse: Trebouxiophyceae
- Ordnung: Chlorellales
- Familie: Chlorellaceae
- Gattung: *Chlorella*

Durch molekularbiologische Untersuchungen erfolgte entsprechend der 18S-rDNA Sequenzen eine taxonomische Einteilung, sodass *C. vulgaris* aus der Klasse der Chlorophyceae in die Klasse der Trebouxiophyceae eingeordnet wurde. Dennoch findet sich in zahlreichen Veröffentlichungen die alte Einteilung bzw. erfolgt keine Trennung dieser beiden Klassen. (Friedl 1995)

Unter günstigen Bedingungen teilt sich eine Mutterzelle innerhalb von 16–20 h in vier Tochterzellen (Ecke 2005). Eine geschlechtliche Vermehrung ist bei dieser Art nicht bekannt (Linne von Berg et al. 2004).

Staehelin (1966) beschreibt den Aufbau der Zellwand mit einer Außenzone (verfestigtes Matrixmaterial ohne Fibrillen), einer Mittelzone (Zellulosefibrillen und abgelöste Plasmalemmaartikel) und einer Innenzone (verfestigtes Matrixmaterial ohne Fibrillen). Durch die in der Zellwand eingelagerten Cellulosen und Hemicellulosen wird die Zellwand von *C. vulgaris* sehr stabil (Miller et al. 1972,1974, Mussnug et al. 2010). Hemicellulosen sind eine Matrix aus verschiedenen Monosacchariden wie z. B. Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, sowie in artspezifischer Verteilung Uronsäure, Proteine, Lipide und Glucosamine (Blumreisinger et al. 1983). Die stabile Zellwand stellt jedoch ein wesentliches Problem zur Gewinnung und Aufbereitung der sensiblen Zellinhaltsstoffe dar.

Aufgrund ihres einfachen Lebenszyklus, hohen Wachstumsraten und der Ähnlichkeit zu höheren Pflanzen, in Bezug auf den Photosyntheseapparat und Stoffwechselprozessen, wurde *C. vulgaris* auch als Modellorganismus für verschiedene Studienzwecke verwendet (Ecke 2005). Die Nutzung von *C. vulgaris* besitzt eine große kommerzielle Bedeutung vor allem für die Herstellung von Lebens- und Futtermitteln, aber auch zunehmend zur Verwendung in Aquakulturen als alternative Quelle von Proteinen für Futtermittelzwecke (Iwamoto 2007). Auch für die Produktion von Biokraftstoffen oder zur Bioremediation wird *Chlorella* intensiv untersucht (Liu und Hu 2013). Weiterhin können Vitamine, Lipide, Chlorophyll und Carotinoide gewonnen werden (Seyfabadi et al. 2011).

3.1.2 *Scenedesmus obliquus*

S. obliquus, auch schiefe Gürtelalge genannt, ist eine 9–15 µm große, häufig vorkommende eukaryotische Mikroalgenart. Die Zellform von *S. obliquus* ist kugelig bis oval und unbegeißelt (Abb. 7).

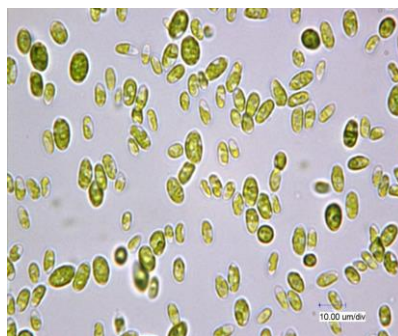


Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahme von *S. obliquus*, (2000-fache Vergrößerung, Keyence VHX100, eigene Aufnahme)

Taxonomisch betrachtet ist *Scenedesmus obliquus* wie folgt einzuordnen (Guiry 2016):

- Wissenschaftlicher Name: *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing
- Abteilung: Chlorophyta
- Klasse: Chlorophyceae
- Ordnung: Chlorococcales
- Familie: Scenedesmaceae
- Gattung: *Scenedesmus*

Die Fortpflanzung erfolgt ungeschlechtlich. Dabei werden Tochterzellen gebildet, welche sich anschließend zu Zönobien formen und daraus neue Zellen freigesetzt werden können (Ettl et al. 1983). *S. obliquus* können daher einzellig aber auch in diesen Zönobien (vor allem in 2er und 4er Zönobien) auftreten. Die Ausbildung von Zönobien hängt von verschiedenen Faktoren ab. Unter Anwesenheit von Fressfeinden wird die Zönobiumbildung als Schutzfunktion gefördert. Hohe Lichtintensitäten oder hohe Temperaturen fördern dagegen die Einzellbildung. (Lürding 1998, Çelekli et al. 2008)

Durch den Einbau von Cellulose, Pektin und Sporopollenin ist die Zellwand wie von *C. vulgaris*-Zellen sehr stabil (Wünschiers 2002).

Die Verwendung von *S. obliquus* wurde im Labormaßstab z. B. zur Abwassernutzung und Wasseraufbereitung, Fixierung von Rauchgas-CO₂, Biokraftstoffherstellung, dem Einsatz in Biogasanlagen und bei der „Hydrothermalen Karbonisierung“ (Inkohlung), sowie als Futtermittelergänzung in Aquakulturen oder Nahrungsergänzungsmitteln untersucht (Carvalho et al. 2006, Hodaifa et al. 2008, 2009a,b, Mandal und Mallick 2009, Mata et al. 2012, 2013, Xin et al. 2010a, b).

3.2 Kultivierungsbedingungen

3.2.1 Algenanzucht und Vorkultivierung

Die Nährmedien für *C. vulgaris* und *S. obliquus* sowie die Kultivierungsbedingungen für die Vorkulturen und Hauptkulturen werden in der Veröffentlichung 4 im Abschnitt 4.2.2 (S. 61) beschrieben.

3.2.2 Versuchsanlage

Die Anlage zur Durchführung der Versuche wird in der Veröffentlichung 4 (Kapitel 4.2.2, S. 61) beschrieben. In Abb. 8 ist der Grundaufbau dargestellt.

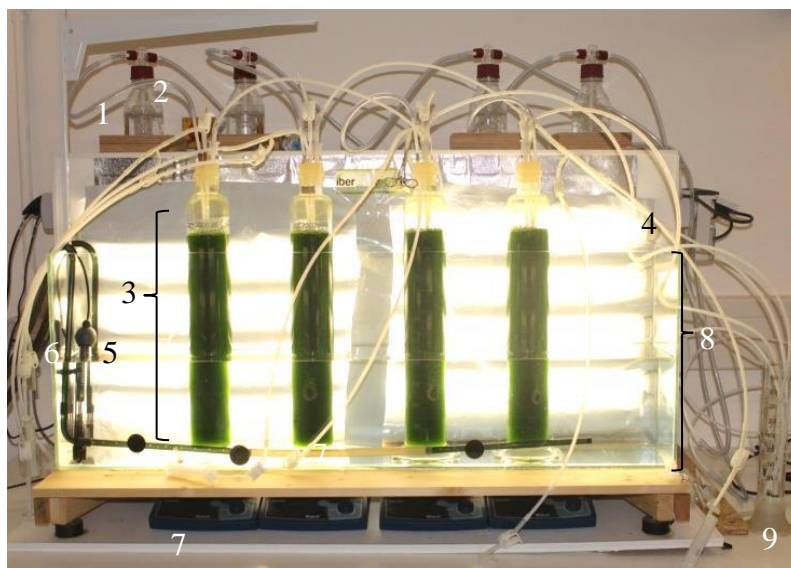


Abb. 8: Versuchsanlage mit 1) Gaswaschflaschen, 2) Stopfen mit Schlauchsystem zur Probenahme, Belüftung und Ableitung der Abluft, 3) Kolben mit Algensuspension, 4) Lichtanlage mit Zeitschaltuhr, 5) Heizstab, 6) Filterschlauch der Filteranlage zur Umwälzung des Wassers, 7) Magnetrührer, 8) Glasbecken, 9) Glaszylinder mit Wasser zur Kontrolle der Abluft

Nicht dargestellt sind die Membranpumpen (KNF LAB Labport, Modell: N 86 KN 18, Deutschland) mit den Sterilfiltern (Sartorius, Modell: Midisart 2000, Deutschland), die zur Einleitung steriler Umgebungsluft über die Flow-Meter und Gaswaschflaschen dienen. Die gleichmäßige Temperaturverteilung des Wassers im Becken erfolgte durch die Umwälzung mit einem Außenfilter (EHEIM, Modell: EHEIM experience, Deutschland). Für jede Algenspezies wurde eine getrennte Versuchsanlage verwendet.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) ist ein Maß für die Lichtdurchlässigkeit durch eine Lösung. Diese wird in einem Photometer bestimmt und entspricht der Extinktion (E_λ). Sie wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge wird der Einfluss absorbierender Pigmente auf die Messung ausgeschlossen (Griffiths et al. 2011b). Die Messung erfolgte in Einwegküvetten (ratiolab®, Modell: Q-Vettes Makro, Deutschland). Es wurde eine Verdünnung der zu analysierenden Probe im linearen Bereich des Photometers (Milton Roy, Modell: Spectronic 401, USA) eingestellt. Die Extinktion lag in einem Bereich zwischen 0,10 und 0,17. Als Blindwert diente einfaches Tamiya-Medium. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Thoma-Zählkammern (Laboroptik Ltd., Großbritannien) genutzt. Diese verfügt über zwei Kammern mit jeweils 16 Großquadraten, welche in je 16 Kleinquadrate gegliedert sind. Ein Großquadrat umfasst eine Fläche von 0,04 mm². Die Kammern haben eine Tiefe von 0,1 mm. Für eine Zählung wurden aus beiden Kammern je sechs Großquadrate nach einem in Abb. 9 dargestelltem Prinzip ausgezählt. Dies wurde pro Probe eines Kolben drei Mal wiederholt, sodass insgesamt 36 Zählungen vorlagen.

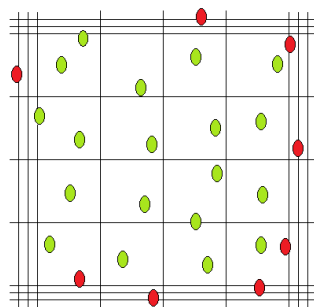


Abb. 9: Bestimmung der Zellzahl innerhalb eines Großquadrates; grün = gezählt, rot = nicht gezählt (Hüber 2014)

Anschließend wurde mittels folgender Formel, die Zellzahl pro ml Algensuspension errechnet:

$$\text{Zellzahl} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot (\text{Zellzahl pro Großquadrat})_{\text{arithm.}}}{0,04 \text{ mm}^2 \times 0,10 \text{ mm}} \times 1\,000$$

arithm. = arithmetische Mittel, Mittelwert pro Großquadrat

3.3.3 Berechnung der Wachstumsrate

Die Ermittlung der Wachstumsrate μ erfolgte auf Basis der ermittelten Zellzahlen im Abstand von 24 bzw. 72 h. In der Veröffentlichung 3 im Kapitel 4.1.2 (S. 51) wird die Berechnung beschrieben.

3.3.4 Bestimmung der Zellgröße

Die Zellgrößenbestimmung und mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Digitalmikroskop (Keyence, Modell: VHX 100, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden von mindestens 80 *C. vulgaris*-Zellen pro Probenahme die Größe ermittelt und der arithmetische Mittelwert errechnet. Es erfolgte keine Bestimmung der Zellgröße von *S. obliquus* auf Grund der sehr unterschiedlichen Morphologie der Zellen, die eine hohe Ungenauigkeit bei der Messung verursachte.

3.3.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde eine Methode zur mehrstufigen methanolischen (MeOH) Extraktion aus *C. vulgaris* und *S. obliquus* nach Lichtenthaler und Buschmann (2001) erarbeitet. Die Extraktion erfolgte mit 100%igem MeOH (Merck, Deutschland) und der Messung der Extinktion E bei entsprechenden Wellenlängen. Als Blindwert wurde 100 % MeOH verwendet. Die Extraktion wurde so oft durchgeführt, bis keine Entfärbung des Pellets nachweisbar war.

Chl a:

$$c_a [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = 16,72 E_{665} - 9,16 E_{652}$$

Chl b:

$$c_b [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = 34,09 E_{652} - 15,28 A_{665}$$

Aus diesen methanolischen Extrakten konnte auch der Carotinoidgehalt ermittelt werden.

$$*c_{\text{Car}} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = (1000 \cdot A_{470} - 1,63 c_a - 104,96 c_b) / 221$$

*als Summe von Xanthophyll und Carotinoiden

Die detaillierte Methodenbeschreibung der methanolischen Extraktion befindet sich in der Veröffentlichung 4 im Kapitel 4.2.2 (S. 62). Parallel dazu wurde am Ende eines Versuches der Chlorophyllgehalt mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) durch die GMBU e.V., Fachsektion Dresden bestimmt. Die Methodenbeschreibung befindet sich in der Veröffentlichung 3 (Kapitel 4.1.2, S. 51). Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung.

3.3.6 Nitratbestimmung

Die Nitratbestimmung erfolgte reflektometrisch mit dem Reflectoquant® RQFlex10®-System (Merck, Deutschland) und den entsprechenden Teststreifen (Merck, Artikelnummer: 116971, Deutschland). Dafür wurden die Proben in Eppendorf Tubes (2 ml, Eppendorf, Deutschland) überführt, bei zu hoher Konzentration mit destilliertem Wasser verdünnt und bis zur Bestimmung verschlossen. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung.

3.3.7 Biotrockenmassebestimmung

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) erfolgte in dreifacher Wiederholung jeweils zum Versuchsbeginn und am Versuchsende. In der Veröffentlichung 4 im Kapitel 4.2.2 (S. 62) ist die Methode zur Biotrockenmassebestimmung detailliert beschrieben.

3.3.8 Ermittlung des täglichen bzw. Gesamtlichtintegrals

Zur Ermittlung des Verhältnisses der genutzten Lichtenergie zur produzierten Biomasse wurde die eingesetzte Lichtenergie über den Versuchszeitraum ermittelt und mit der produzierten Menge von Biomasse bzw. bestimmten Inhaltsstoffen ins Verhältnis gesetzt. Das tägliche Lichtintegral (DLI) ergibt sich aus der Photonendichte und der täglichen Lichtdauer t_t [s]:

$$\text{DLI} [\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}] = (\text{PFD} \cdot t_t) / 1000000$$

Das Gesamtlichtintegral TLI ergibt sich aus dem DLI und der Versuchsdauer t_v [d]:

$$\text{TLI} [\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}] = \text{DLI} \cdot t_v$$

Das Gesamtlichtintegral bezogen auf den zellulären und volumetrischen Ertrag ergibt sich aus dem jeweiligen Gehalt des Produktes X und dem TLI:

$$\text{TLI}_x [[\text{g} \cdot \text{Zelle}^{-1}] \text{ bzw. } [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] \cdot \text{mol} \cdot \text{m}^{-2}] = X \cdot \text{TLI}^{-1}$$

$$X: \text{Produkt bzw. Produktgehalt } [\text{g} \cdot \text{Zelle}^{-1}] \text{ bzw. } [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$$

3.3.9 Ermittlung der Inhaltsstoffe aus der Algentrockenmasse

Für die weitere Auswertung zum biochemischen Profil der Algenbiomasse wurden entsprechende Proben gefriergetrocknet und in einem externen Labor weiter aufgeschlossen, die Inhaltsstoffe extrahiert und quantifiziert. Die genaue Methodenbeschreibung befindet sich in der Veröffentlichung 3 im Kapitel 4.1.2 (S. 51).

3.3.10 Rasterelektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen

Um die Oberflächenmorphologie beider Algenarten dazustellen, wurden Untersuchungen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) am Dresden Center for Nanoanalysis an der Technischen Universität Dresden durchgeführt. Damit sollten folgende Eigenschaften untersucht werden:

- Oberflächenmorphologie der Zellen in Abhängigkeit von der Spezies und der Behandlung,
- Verteilung bestimmter Elemente (u. a. P, N, Mg) in den Zellen und
- Unterschiede in der Elementverteilung durch z. B. verschiedene Behandlungen.

Rasterelektronenmikroskop

Das Rasterelektronenmikroskop basiert auf einem feingebündeltem Primärelektronenstrahl, der zeilenweise über die Probenfläche geführt wird. Der Abbildungsvorgang findet im Hochvakuum statt, damit der Elektronenstrahl von der Quelle bis zur Probe gelangen kann. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, sind elastische und inelastische Wechselwirkungen möglich. Die Signale werden von verschiedenen Detektoren für Sekundär- und Rückstreuelektronen aufgefangen und in Grauwertinformationen umgewandelt (Abb. 10). Diese Daten werden anschließend auf einem Bildschirm dargestellt und Informationen über die Oberflächenstruktur der Probe erhalten.

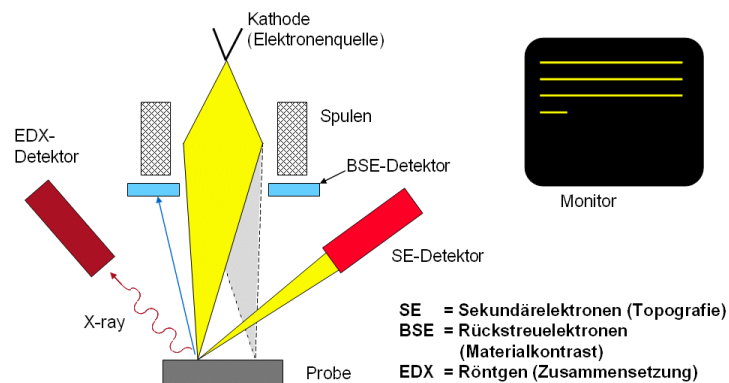


Abb. 10: Ablauf zur Bilderstellung mit einem REM mit EDX-Detektor (Ziel 2003)

Die Röntgenstrahlung entsteht, wenn ein Elektron des Elektronenstrahls im Atom der Probe ein kernnahes Elektron aus seiner Position schlägt. Diese Lücke wird sofort von einem energiereicheren Elektron aus einem höheren Orbital aufgefüllt. Die Energiedifferenz wird in Form eines Röntgenquants frei. Die dadurch entstandene Röntgenstrahlung ist charakteristisch für den Übergang und das Atom des Elementes. Durch die Auswertung der Energie (Intensität) des Röntgenquants, kann auf das Element geschlossen werden. Dies wird mit dem EDX-Detektor analysiert. Der EDX-Detektor befindet sich im Rasterelektronenmikroskop, sodass die Elementanalyse im Zusammenhang mit der REM-Abbildung erfolgt und lokal zugeordnet werden kann.

Für die Untersuchungen wurde ein Rasterelektronenmikroskop Gemini 500 (Zeiss, Deutschland) mit dem EDX-System X-MAXⁿ 150 (Oxford Instruments, Großbritannien) eingesetzt.

3.4 Statistik

Die Beschreibung der statistischen Methoden befindet sich in der jeweiligen Veröffentlichung im Kapitel 4.1.2 (S. 52), 4.2.2 (S. 62) und 4.3.2 (S. 72). Es wurde das Statistische Analyse System (SAS 9.4, SAS Ins., Cary, NC, 2014) verwendet. Signifikanzen wurden bei einem Signifikanzlevel von $p < 0,05$ für alle bestimmten Variablen definiert.

3.5 Mikroalgenbehandlungen

3.5.1 Versuchsgrundaufbau

Für alle Versuche wurden für die Temperatur des Wasserbeckens, den Luftdurchfluss und die optische Dichte Start- bzw. Randparameter festgelegt und damit definierte Ausgangsbedingungen geschaffen. Der Zeitpunkt und Ablauf der Probenahmen erfolgte nach einem festgelegtem Schema. Die Beschreibung des grundlegenden Versuchsaufbaus wird in der Veröffentlichung 4 (Kapitel 4.2.2, S. 61) beschrieben.

3.5.2 Belichtung

Die Belichtung der Vorkulturen wird in der Veröffentlichung 4 (Kapitel 4.2.2, S. 61) beschrieben. Die Belichtung der Algensuspensionen für die Versuche erfolgte mit Leuchtstofflampen (Osram: L36 W/840 Lumilux, Deutschland) entsprechend der Beschreibung im Kapitel 4.2.2 (S. 61).

Die zu behandelnden Kulturen wurden in zwei Gruppen unterteilt mit jeweils zwei Kolben. Es wurden alle acht Leuchtstoffröhren eingeschaltet, jedoch so abgedeckt (siehe Abb. 11, vgl. Abb. 8), dass jeweils zwei Kolben Licht von jeder zweiten Lampe erhielten. Zusätzlich erfolgte bei Bedarf und Versuchsaufgabe eine Lichttrennung der Kolben in der Mitte des Wasserbeckens durch lichtundurchlässige Folie, sodass keine Verfälschung zwischen den Kolben 1|2 und den Kolben 3|4 stattfinden konnte. Die Schaltung der Lampen wurde so installiert, dass mittels Zeitschaltuhr verschiedene Tag-Nacht-Regime für jeweils zwei Kolben einstellbar waren.

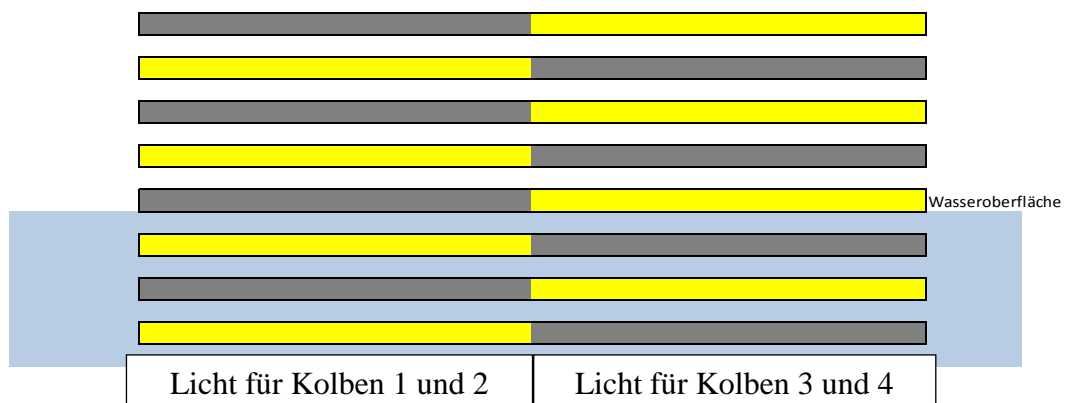


Abb. 11: Anordnung der Belichtung, jede Leuchtstoffröhre (gelb) wurde halbseitig durch lichtundurchlässige Folie abgedeckt (grau)

Für die LED-Belichtung wurden die entsprechenden Leuchtstoffröhren komplett für zwei Kolben mit lichtundurchlässiger Folie abgedeckt und auf der gegenüberliegenden Seite des Wasserbeckens das LED-Modul montiert. In der Mitte des Wasserbeckens erfolgte in der Mitte ebenfalls eine lichtundurchlässige Trennung zwischen den Kolben 1|2 und 3|4, sodass von allen Seiten sichergestellt wurde, dass die Kulturen der zwei betreffenden Kolben nur durch die LED belichtet wurden (Abb. 12).



Abb. 12: Anordnung bei LED-Belichtung für 2 Kolben

Das LED-Modul bestand aus roten (Osram LH W5AM hyper red), blauen (Osram LD W5AM deep blue) und grünen (Osram LT W5AM true green) Dioden, die im Verhältnis von 49:26:25 angesteuert wurden. Es ergab sich eine PFD von $305,0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

In Anhang A 2 (S. 149) befinden sich die Emissionsspektren der verwendeten Lichtquellen.

3.5.3 UV-Behandlung

3.5.3.1 Messaufbau

Zur Behandlung der Mikroalgen mit UV-Strahlung wurde in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Fa. Neon Böhm GmbH & Co.KG (ZIM-Kooperationsprojekt, Förderkennzeichen: 2223307AK2) eine spezielle Anordnung in Form eines Bypassreaktors zur Behandlung der Algenkultur mit UV-A und UV-B-Strahlung entwickelt, um eine nicht thermische Bestrahlung der Algenkulturen mit UV-A- und UV-B-Strahlung zu ermöglichen. Die Entwicklung des Bypassreaktors zur UV-B-Bestrahlung wurde als Gebrauchsmuster (Nr. 202013002586.7) angemeldet. Das Gebrauchsmuster besteht aus einer Niederdruckentladungslampe, welche von Algenkultur in einem umgebenden Glasmantel umspült werden kann. Die emittierende Fläche der Entladungslampe wurde materialseitig so gestaltet, dass die Strahlungsdurchlässigkeit bis in den UV-B-Bereich gewährleistet war. Für den Außenmantel wurde Natron-Kalk-Glas ausgewählt, welches für UV-Strahlen undurchlässig ist und somit die Bestimmungen bei Einsatz von UV-Strahlern auch ohne Anwendung von zusätzlichen Schutzmitteln eingehalten werden konnte. Durch den die Leuchtstofflampe umgebenden Mantel, konnte das zu bestrahlende Medium mit variablen Fließgeschwindigkeiten transportiert werden (Abb. 13).

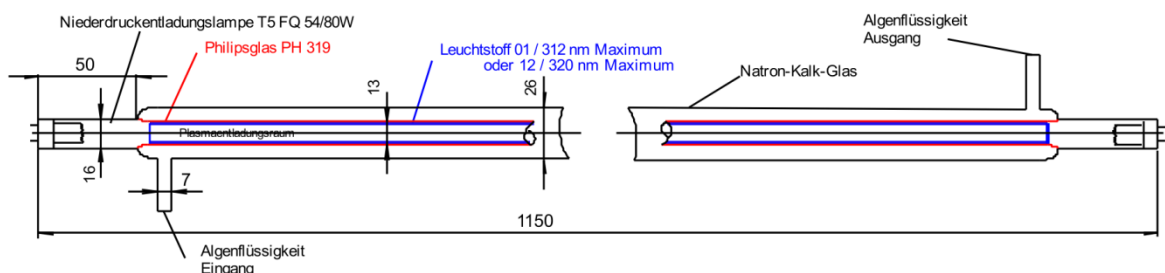


Abb. 13: Bypassreaktor zur Behandlung mit UV B Strahlung (Sommer 2012)

Als Leuchtstofflampenglas diente ein Spezialglas von Philips mit der Bezeichnung PH 319. Für die Beschichtung im Inneren der Leuchtstofflampe wurde ein bei 312 nm emittierender Leuchtstoff mit einer Bandbreite von 5 nm für die UV-B Bestrahlung eingesetzt.

Für den Strahler im UV-A-Bereich wurde ein doppelwandiges Gefäß zur Durchleitung des Algenmediums gestaltet, welches über eine mit UV-A-Strahlung emittierende Niederdruckentladungslampe gesteckt werden konnte (Abb. 14). Das doppelwandige Gefäß aus Borosilikatglas besteht aus einem für die UV-A-Strahlung zu 90 % durchlässigen Glasmantel. Durch diese Anordnung wurde gewährleistet, dass der Strahlungseintrag über die gesamte Innenfläche des doppelwandigen mit Algenflüssigkeit durchströmten Materials erfolgen kann.

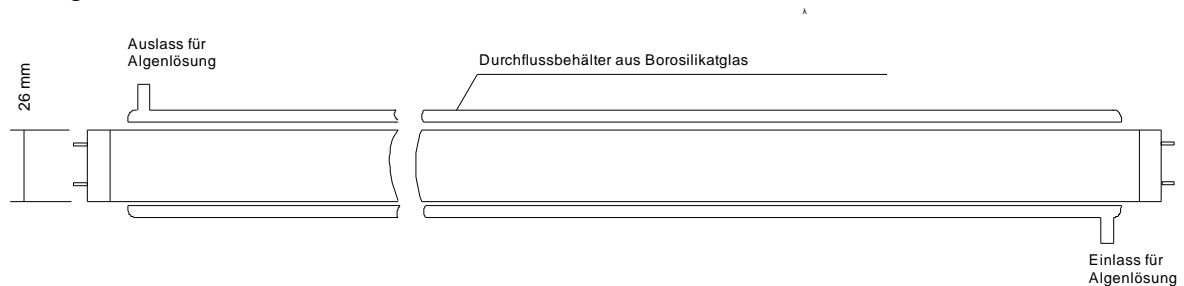


Abb. 14: Bypass-System zur Bestrahlung mit UV-A-Strahlung (Sommer 2012)

Für die Versuche wurde eine Lampe mit einem Leuchtstoff (BLB T8/18 LS010) mit einem Peak bei 370 nm im ungedimmten Betriebszustand eingesetzt. Über eine Bypassführung (Abb. 15) wurde die Algensuspension durch Kreiselpumpen (5 l/min, Fa. Rotec, Österreich) zwischen dem Kultivierungskolben und dem UV-Strahler gepumpt. Die Probenahme und Bestimmung der zu analysierenden Wachstumsparameter und Stoffwechselprodukte erfolgte entsprechend der Beschreibung in der Veröffentlichung 3 und 4 (Kapitel 4.1.2, S. 51 und 4.2.2, S. 61).

Das Spektrum der UV-Strahler befindet sich im Anhang A 2 (S. 149).

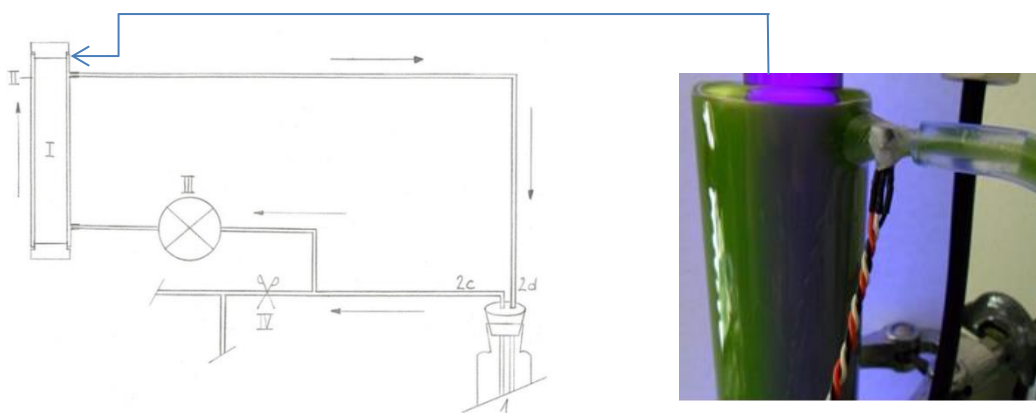


Abb. 15: Schema zur Bypassführung nach Weiß (2015) (I: UV-Lampe (rechts Nahaufnahme), II: doppelwandiger Glasmantel zum Durchströmen der Algensuspension, III: Pumpe, IV: Probenahme, 1: Kultivierungskolben, 2 c: Ausgang, 2 d: Eingang)

3.5.3.2 Vorversuche

Es wurden mit den entwickelten UV-A- und UV-B-Bypassreaktoren Vorversuche durchgeführt. Dafür wurden bei einem standardisiertem 14:10-h Tag-Nachtzyklus (Tagphase: 8:00–22:00 Uhr) *C. vulgaris*-Kulturen einmalig am Tag bzw. mehrmalig/mehrtägig mit zusätzlicher UV-A bzw. UV-B-Strahlung behandelt (Tab. 8). Durch die in Kapitel 3.5.3.1 (S. 41) beschriebenen Bypasssysteme wurde die Algensuspension entlang der Strahler geleitet. Mit Ausnahme der Bestrahlung während der Nacht, erfolgte die UV-Bestrahlung während der Tagphase zusätzlich zur Belichtung mit Leuchtstoffröhren.

Tab. 8: Versuchsaufbau der Vorversuche zur UV-Behandlung (Tag 1 = Starttag)

Versuch/ Kolbennr.	Behandlung	Zeitpunkt, Dauer	Bemerkung
1/4	Einmalig, UV-A	- Tag 3, 12-19 Uhr	- Tagbestrahlung
	Mehrtägig,		- Tagbestrahlung
2/1	UV-B	- Tag 2/5/8/11, 15-16 Uhr	
2/2	UV-A	- ab Tag 2, 11-18 Uhr	
	Mehrtägig,		- Zusätzlich 0,5 % CO ₂
3/1	UV-B	- ab Tag 2, 16-17 Uhr	- Tagbestrahlung
3/2	UV-A	- ab Tag 2, 1:30-6:30 Uhr	- Nachtbestrahlung
4/3	Einmalig, UV-A	- Tag vor der Ernte (14:30 Uhr) bis 10 Uhr am Folgetag	- Tag- und Nacht- bestrahlung

3.5.3.3 Weiterführende Versuche

Durch die Auswertung der Untersuchungen des Einflusses verschiedener Tag-Nacht-Regime auf die Wachstums- und Stoffwechselprozesse von *C. vulgaris* (Veröffentlichung 3 im Kapitel 4.2 (S. 49) und 4 im Kapitel 4.3 (S. 59)) wurde im Hinblick auf die Biomassebildung und Lichtnutzung ein Tag-Nacht-Regime von 20:4-h festgelegt. Weitere Versuche erfolgten darauf aufbauend im Rahmen einer Bachelorarbeit von Weiß (2015).

Dabei wurde eine Behandlung mit dem UV-A Bestrahlung nach folgendem Schema durchgeführt:

- Start: 24 h nach Versuchsbeginn
- Dauer: 6 h täglich
- Beginn der Bestrahlung: 9 h nach Beginn der Tagphase
- Tag-Nacht-Regime: 20:4-h
- Versuchsdauer: 192 h
- UV-A Bestrahlung zusätzlich zur Belichtung mit Leuchtstoffröhren.

Die Behandlung erfolgte bis zum Versuchsende nach 192 h. Ausgewertet wurden die Parameter Zellzahl, Biomasse, optische Dichte sowie der Gesamtchlorophyll-, Chlorophyll a und b- und der Carotinoidgehalt durch methanolische Extraktion entsprechend der im Kapitel 3.3 (ab S. 36) beschriebenen bzw. verwiesenen Methoden.

3.5.4 Mikrowellenbehandlung

3.5.4.1 Vorversuche

Ziel der Untersuchungen war die Bestrahlung von *C. vulgaris* und *S. obliquus* mit Mikrowellen im nicht-thermischen Bereich. Im Rahmen des Kooperationsprojektes „Nutzung einer Mikrowellenmodifikation an Algen für neue Applikationsfelder“ (Förderkennzeichen: KF2223306MD1) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Fa. AFT microwave GmbH. Um mögliche Frequenzabhängigkeiten des Tamiya-Nährmediums bzw. der Algenzellen von Mikrowellen zu identifizieren, wurden zunächst Vorversuche mit einer *C. vulgaris*-Kultur und dem Nährmedium durchgeführt. Die Messungen im Niederfrequenzbereich (10 MHz bis 2,7 GHz) sowie Breitbandmessungen (10 MHz bis 18 GHz bzw. 10 MHz bis 125 GHz) erfolgte durch die Mitarbeiter der AFT microwave GmbH.

3.5.4.2 Messaufbau

Ausgehend von den Vorversuchen, den Ergebnissen von Schröder (2012) und Beratungen mit dem Projektpartner AFT microwave GmbH wurde das bautechnische Konzept zur Mikrowellenbehandlung aus der Veröffentlichung 2 (Kapitel 2.2.3.2, S. 23) überarbeitet.

Es wurde zur Bestrahlung der Algen eine entsprechende Anlage mit einem Mikrowellensender aufgebaut (Abb. 16). Als Sendequelle diente ein 2 kW Magnetron. Das Magnetron saß an einem Hohlleiter, der die Energie an zwei Richtkoppler vorbei zur Messung der Leistungen in den Applikator lenkte.

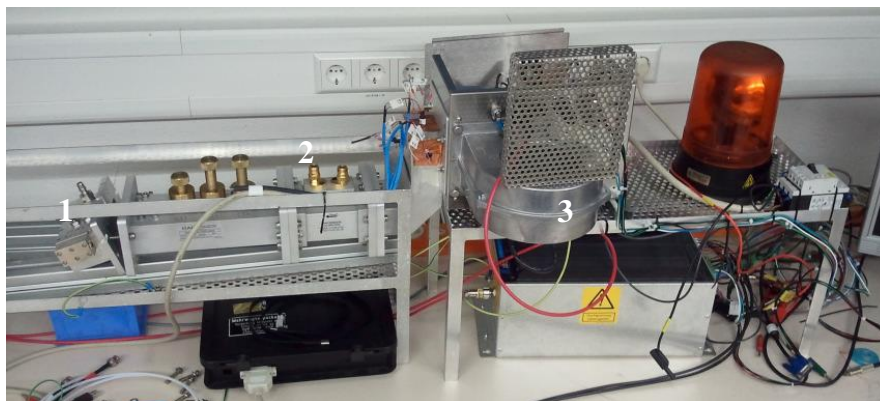


Abb. 16: Experimenteller Messaufbau zur Mikrowellenbehandlung (1: Applikator, 2: Hohlleiter, 3: Magnetron)

Im Applikator befanden sich zwei miteinander verbundene Glasröhrchen, durch die die Algensuspension geleitet wird (Abb. 17). Da ein Teil der Mikrowellen an den Glasröhrchen reflektiert wird und somit die Ausbreitung der Mikrowellen gestört werden würde, wurden weitere Störstellen, sogenannte Anpasselemente, eingebaut. Diese erzeugen ebenfalls Reflexionen der Mikrowellen, die 180° Phasen versetzt sind und die gleiche Amplitude wie die Reflexion an den Glasröhrchen besitzen. Dadurch werden die Reflexionen gegenseitig ausgelöscht. Die maximale E-Feldstärke im Hohlleiter ergibt sich aus einer stehenden Welle. Am Hohlleiterende werden alle E-Felder kurzgeschlossen, sodass sie an dieser Stelle null ist. Ein Viertel der Wellenlänge entfernt befand sich das Maximum der Feldstärke, wo die Glasröhrchen für die Algenkultur platziert wurden.

Zur Ansteuerung der Anlage wurde ein Schaltnetzteil (Abb. 17) verwendet, das kurze Ein- und Ausschaltzeiten besaß, um einen Pulsbetrieb zu ermöglichen.



Abb. 17: Innenansicht der Glasrohrlast (links), Schaltnetzteil (rechts)

Der Durchfluss der Algensuspension wurde durch den Applikator mittels einer angeschlossenen Kreislumpumpe (Rotek, Modell: WPDC-05.0L-7.5M-24-VP, Österreich) so eingestellt, dass die Algen nur einem kurzen Mikrowellendoppelpuls ausgesetzt wurden. Die Leistung konnte an der Anlage zwischen 200 W und 1200 W eingestellt werden, wobei diese einen zeitlichen Drift, insbesondere bei geringeren Leistungseinstellungen, zu höheren Leistungen aufwies. Dieser Drift wurde durch Schwingungen der Röhre im Magnetron auf Grund der betriebsweise im untersten Leistungsbereich verursacht (Arnold 2013). Ein stabiler Arbeitsbereich konnte nach Angaben von Arnold (2013) nur bei 30–100 % der Nominalleistung gewährleistet werden.

Über ein Bypass-System wurde die durch den Projektpartner AFT microwave GmbH erbaute Anlage an das Kultivierungssystem angeschlossen (Abb. 18).

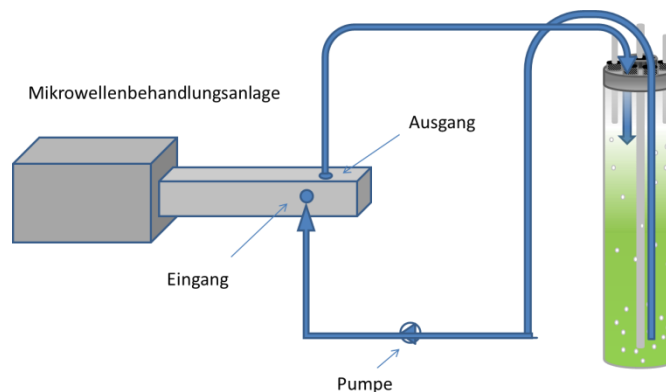


Abb. 18: Schematische Abbildung zur Bypassführung zur Mikrowellenbehandlung zwischen dem Applikator und dem Behandlungskolben

Darüber konnte entsprechend der Behandlungszeit ein definiertes Volumen im geschlossenen Kreislauf aus dem Kultivierungskolben in die Anlage gepumpt und wieder zurück in diesen Kolben geleitet werden (maximale Pumpleistung 4 l/min). Sowohl vom Kultivierungskolben zur Anlage hin als auch wieder zurück zum Kolben wurde jeweils eine Schlauchlänge von ca. 2 m eingerichtet. Dies diente einer schnellen Temperaturabkühlung nach der Behandlung, um thermische Effekte zu verhindern. Zur Kontrolle der Temperaturentwicklung erfolgte die Temperaturmessung im Kultivierungskolben mit dem Temperatur-Datenlogger 177-T4 (Testo, Deutschland) jeweils zu Beginn und am Ende

einer Behandlung. Da sich die Kultivierungskolben in einem temperaturkontrolliertem Wasserbecken befanden, hatten die Algensuspensionen in den Kolben eine homogene Temperaturverteilung. Die Behandlungen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten während der 240 h Versuchszeit mit Variation der Häufigkeit, Intensität und Dauer.

3.5.4.3 Versuchsdurchführung

Die Behandlung erfolgte in gepulster Form durch intervallartige Bestrahlung mit einer 5 minütigen Unterbrechung zwischen den jeweiligen Behandlungsschritten. Diese Pause ergab sich zum einen durch den bereits erwähnten Leistungsdrift der Anlage bei geringen Leistungseinstellungen und zum anderen durch die schnelle Temperaturzunahme bei einer Bestrahlung ab 30 Sekunden. Auf Basis der Literaturrecherche und Ergebnissen aus Vorversuchen sollten bei den Behandlungen nur geringe Leistungen eingestellt werden, jedoch die Behandlungen wiederholt stattfinden, um auch die Temperaturerhöhung bei hohen Energieeinträgen zu vermeiden. Die Behandlungsschemen befinden sich in Tab. 9. Die Versuche fanden während der Tagphase in jeweils unterschiedlichen Kolben statt.

Tab. 9: Behandlungsschema für *C. vulgaris* (Tag 10) und *S. obliquus* (Tag 4/7/10)

	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>
Behandlung 1	gepulst, 10 x 30 s + 10 x 15 s	kontinuierlich bis 38°C
Behandlung 2	gepulst, 15 x 15 s	gepulst, 10 x 15 s

S. obliquus wurde zusätzlich mit einer einmaligen, Dauerbestrahlung bis zu einem Temperaturschwellwert von 38°C behandelt. Bei dieser Temperatur konnte zwar ein Temperatureffekt auf den Stoffwechsel der Algenzellen nicht ausgeschlossen werden, aber eine Schädigung der Algen bzw. deren Produkte durch z. B. Denaturierungserscheinungen waren bei dieser Temperatur nicht zu erwarten.

3.5.5 CO₂-Begasung

3.5.5.1 Ausgangspunkt

Der verfügbare Kohlenstoff in aquatischen Systemen spielt einen limitierenden Faktor bei der Kultivierung der Mikroalgen, da dieses auch das Hauptelement der Mikroalgenbiomasse darstellt. Daher muss eine Kohlenstoffversorgung erfolgen, da sonst auch keine physiologischen Prozesse (Photosynthese, Stoffaufbau) ablaufen können. Auf Grund der mit zunehmender Zellzahl festgestellten pH-Wert-Erhöhung über den als Optimum definierten Bereich von pH 7 bis 9, sollte zur pH-Wert-Stabilisierung die Anreicherung der Begasungsluft mit technischem CO₂ untersucht werden (Coutteau 1996).

Verantwortlich für diese pH-Wert-Charakteristik sind verschiedene miteinander wechselwirkende Prozesse, wie die Kohlenstoffverwertung der Algen und das Kohlenstoffdioxid-Bicarbonatgleichgewicht (CO₂-H₂CO₃-HCO₃⁻-CO₃²⁻) im Medium, welches auch das wichtigste Puffersystem im Frischwasser darstellt (Grobelaar 2007). Welche kohlenstoffhaltigen Ionen vorliegen, hängt dabei vom pH-Wert des Mediums ab. Je höher der pH-Wert ist, desto mehr Hydrogencarbonat (HCO₃⁻)- und Carbonationen (CO₃²⁻) liegen vor. Der pH-Wert ändert sich zudem durch die C-Fixierung während der Photosynthese. Bei der Aufnahme von HCO₃⁻ aus dem Medium müssen auch H⁺-Ionen aufgenommen werden,

sodass OH^- Ionen im Medium verbleiben (Ellenberg und Teuscher 2010). Durch diese Verminderung der H^+ -Ionenkonzentration steigt der pH-Wert im umgebenden Medium. Der pH-Wert des Mediums kann ebenfalls durch den Verbrauch von Nitrat und Phosphat steigen, da hierbei H^+ -Ionen verbraucht werden (Lower 1996).

Durch Ziegler (2013) wurde auch die Wirkung von Phosphatpuffern, Carbonatlösungen und der Zugabe von HCl zur Stabilisierung des pH-Wertes untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass die Pufferlösungen keinen langanhaltenden Effekt bewirkten. Auch die Gabe von NaCO_3 und HCL zeigten keinen für die Versuche dienlichen Effekt. Hierbei entstand zusätzlich das Risiko der Versalzung des Mediums.

3.5.5.2 Versuchsaufbau

In Form eines Steigerungsversuches mit einer *C. vulgaris*-Kultur, wurde die Luft mit verschiedenen Konzentration CO_2 angereichert, um den Einfluss auf das Wachstum und den pH-Wert zu untersuchen. Die Versuchsanordnung war wie folgt:

Kolben 1: konstante Konzentration von 1 % CO_2

Kolben 2: konstante Konzentration von 0,04 % CO_2 (Kontrolle, nur sterile Umgebungsluft)

Kolben 3: gestaffelte Konzentration von 1-3 % CO_2 (1 %: 0–24 h, 2 %: 25–96 h,
3 %: 97 h–Ende)

Kolben 4: gestaffelte Konzentration von 1-2 % CO_2 (1 % 0–24 h, 2 % 25 h–Ende)

Die Zugabe von technischem CO_2 (100 % reines CO_2 , Air liquide) wurde manuell eingestellt und mit einem Polytektor II G750 (GfG, Deutschland) überwacht. Für die Versuche mit zusätzlichem CO_2 wurden alle acht Leuchtstoffröhren eingeschaltet, um den höheren Lichtbedarf bei höherer Zellzahl länger gerecht zu werden. Die Lichtintensität betrug durchschnittlich $610 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5.6 Nitratversuch

Zur Überprüfung des Nitratinflusses wurde die KNO_3 -Konzentration auf $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ im Nährmedium verdoppelt. Dieser Medium wurde für zwei Kulturen verwendet und mit zwei Kulturen, die das Standardmedium erhielten, verglichen. Der Versuch erfolgte bei kontinuierlicher Belichtung. Entsprechende Proben wurden zu den gewöhnlichen Probenahmezeitpunkten (siehe Veröffentlichung 4, S. 60) genommen und entsprechende Analysen der Inhaltsstoffe durchgeführt. Dieser Versuch wurde mit *C. vulgaris* durchgeführt und erfolgte in Doppelbestimmung.

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung von Mikroalgen unter Kunstlicht

4.1.1 Kurzfassung der Veröffentlichung

Sowohl die Lichtintensität als auch die spektrale Zusammensetzung der Lichtquelle bestimmen wie viel Energie den Mikroalgen für die Photosynthese und Stoffwechselaktivität zur Verfügung steht (Sforza et al. 2012, Khoeyi et al. 2012). LED besitzen gegenüber anderen Lichtquellen, wie Leuchtstoffröhren, die Vorteile einer geringen Größe, einer langen Lebenszeit, einer geringen Wärmeentwicklung und sie emittieren einen schmalbandigen Spektralbereich. Die technischen Eigenschaften der LED ermöglichen zudem den Einsatz außerhalb und innerhalb der Reaktoren. Zur Untersuchung des Einflusses einer ausgewählten spektralen Zusammensetzung des Lichtes, wurde ein LED-Modul verwendet und die Dioden im Verhältnis von 49:26:25 rot:blau:grün (RBG) angesteuert. *C. vulgaris* diente als Modellorganismus. Als Kontrolle erfolgte eine Belichtung mit Leuchtstoffröhren. Für die Untersuchungen wurde ein Tag-Nacht-Regime von 20:4-h ausgewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der ausgewählten LED-Belichtung ein um 20 % höherer Biomassertrag und eine um 12 % höhere Zellzahl erreicht wurden. Zudem war die Produktion der Biomasse bezogen auf die eingesetzte Lichtenergie deutlich effizienter und der Stromverbrauch um 30 % geringer. Der zelluläre Anteil von α -Linolensäure wurde in den LED-belichteten Zellen erhöht, sodass sich das Fettsäurenverhältnis von 1,55 (FL) auf 0,87 (LED) verringerte. Dies kann durch die Anregung spezifischer Enzymaktivitäten auf Grund der spektralen Zusammensetzung entlang des ω -3 und/oder des ω -6-Synthesepfad verursacht worden sein. Zudem konnte auch der Gehalt an Lutein und Astaxanthin in den Zellen der LED-Kulturen erhöht werden. Die Verringerte Konzentration von Chl a und Chl b deuten auch auf eine Anpassung der Pigmentzusammensetzung an die spektrale Eigenschaften der LED hin.

Die Ergebnisse zeigen, dass Kunstlicht, speziell mit LED, genutzt werden kann, um den Biomassertrag bzw. das biochemische Profil der Algenzellen am Beispiel von *C. vulgaris* gezielt zu beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen die Ergebnisse weiterer Studien, welche nachgewiesen haben, dass eine entsprechende spektrale Zusammensetzung eine hohe Effektivität für die gesteuerte Kultivierung von Mikroalgen erzielt werden kann (Okumura et al. 2014). Auf der anderen Seite wiesen die Ergebnisse starke Schwankungen im biochemischen Profil, insbesondere bei den mit Leuchtstoffröhren belichteten Zellen, auf. Dies kann u.a. durch Schwankungen im Stoffwechsel und einem unterschiedlichen physiologischem Zustand der Zellen verursacht werden.

4.1.2 Veröffentlichung 3

Cultivation of microalgae in closed systems under artificial lighting

C. Scharff^{1,a}, N. Domurath², M. Wensch-Dorendorf³ and F.-G. Schroeder¹

¹University of Applied Sciences Dresden Faculty for Agriculture/Landscape Management 01326 Dresden Germany; ²INTEGAR -Institute of Horticulture Technologies, Schlüterstraße 29, 01277 Dresden, Germany; ³Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Agricultural and Food Sciences, 06120 Halle, Germany

^ascharff@htw-dresden.de

Abstract

Microalgae potential applications ranges among other things from food supplements, animal feed, fertilizer, waste water treatment or as renewable resource for biodiesel. Currently the commercial use is limiting the biotechnological potential of algae because of less efficiency of yields, extraction of sensitive products and high costs during process. Microalgae can be produced in open and closed systems. Light, provided by sunlight or artificial light sources, is a key parameter for microalgae growth and biosynthesis of several high value compounds. Artificial lighting offers the option of defined conditions regarding to the target of microalgal biomass as well as special metabolites. On the other side artificial light is a main cost factor (energy intensive) during processing. Sunlight can be used as a cheap light source but has low photosynthetic efficiency and shows fluctuating unstable conditions. Compared to other light sources light emitting diodes (LED) provides advantages like small size, long life-expectancy and minimized heat generation by electrical efficiency and emitting nearly monochromatic light. The microalgae species, *C. vulgaris* was cultivated photoautotroph and exposed with LED lights (combination of 49:26:25 red:blue:green LED) as well as with fluorescent lights (FL) in a 20:4-h light:dark regime for about 240 h. Determination of growth pattern and biochemical profile show a higher biomass yield (+20 %) according to higher cell concentration (+12 %). Furthermore chlorophyll and protein contents were much less compared to FL exposed cultures, but with higher biomass yield more of these compounds can be produced.

Keywords: green algae, light, LED, wavelength, growth

Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017a. Cultivation of microalgae in closed systems under artificial lighting. Acta horticulturae. 1170: 1157–1164.

doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.149

4.2 Einfluss verschiedener Lichtregime auf das Wachstum von *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus*

4.2.1 Kurzfassung der Veröffentlichung

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Photoperioden auf das Wachstum und die Biomasseproduktion wurden zwei Mikroalgenarten, *C. vulgaris* und *S. obliquus*, mit verschiedenen Tag-Nacht-Regimen behandelt. *C. vulgaris*-Kulturen wurden mit Regimen von 14:10-h, 20:4-h, 22:2-h und 24:0-h und *S. obliquus* zusätzlich mit 16:8-h und 18:6-h untersucht. Die Belichtung erfolgte mit Leuchtstoffröhren. Die Kultivierung erfolgte photoautotroph in einem batch-betriebenen und temperaturkompensiertem Photobioreaktorsystem (4 x 2 l, T = 27°C, Begasung mit steriler Umgebungsluft). Es wurden Wachstumsparameter wie die Wachstums- und Verdopplungsrate, die Biotrockenmasse sowie die optische Dichte, Zellzahl der Chlorophyllgehalt und der pH-Wert bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS.

Die Auswertung der Wachstumsraten ergaben unterschiedliche Wachstumsprofile sowohl in Abhängigkeit von der Spezies als auch von dem eingesetzten Lichtregime. Beide Spezies zeigten dabei keine bzw. eine sehr kurze Adaptionsphase zu Beginn der Versuche. *S. obliquus*-Kulturen zeigten in Abhängigkeit des Lichtregimes ein zweites Ansteigen der Wachstumsrate zwischen 96 und 144 h nach Versuchsbeginn. Mit zunehmender Dauer der Tagphase, begann der zweite Anstieg früher und desto höher war der Biomassertrag am Ende des Versuches. Bei *C. vulgaris* deutete sich ein kurzer Anstieg der Wachstumsrate zwischen 144 und 192 h der Versuchszeit an, konnte jedoch nicht in der 14:10-h Variante nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass mit zunehmender Länge der Tagphase Stickstoff früher limitiert war, wobei der Zeitpunkt, bei dem kein Stickstoff in Form von Nitrat nachweisbar war, um 24 bis 48 h bei dem jeweiligen Lichtregime schwankte. Dieser Zeitpunkt der Stickstoffverarmung entsprach etwa dem zweiten Anstieg der Wachstumsrate bei *S. obliquus*. Der Biomassertrag war in den Proben der Dauerbelichtung um den Faktor 1,9 bei *C. vulgaris* und das 1,6-fache bei *S. obliquus* im Vergleich zum 14:10-h Regime erhöht.

Es konnte ebenfalls eine behandlungsspezifische Reaktion an Hand des Verhältnisses von Chlorophyll a zu Carotinoiden aus den methanolischen Extrakten nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine unterschiedliche Stressreaktion auf Grund der Nährstoffverarmung und Lichtlimitierung durch z. B. Selbstbeschattung zurückzuführen sein.

Unter Berücksichtigung des Gesamtlichtintegrals (TLI), bezogen auf den Biomassertrag, zeigte es sich, dass die Umwandlung der Lichtenergie in Biomasse mit zunehmender Tageslänge abnimmt. Zusätzliche Energie könnte in Wärme umgewandelt oder für andere biochemische Prozesse genutzt werden. Durch die Dauerbelichtung könnten auch notwendige Enzymaktivitäten inhibiert werden, wodurch z. B. die Photosynthese weniger effektiv ist (Abu-Gosh et al. 2015). Im Hinblick auf die Produktion von Biomasse ist es daher bezogen auf die eingesetzte Lichtenergie wirtschaftlicher mit kürzeren Photoperioden zu arbeiten. Einflüsse auf das biochemische Profil müssen dazu weiter diskutiert werden.

4.2.2 Veröffentlichung 4

Influence of different light irradiation regimes on growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*

C. Scharff^{1,a}, N. Domurath², M. Wensch-Dorendorf³ and F.-G. Schroeder¹

¹University of Applied Sciences Dresden Faculty for Agriculture/Landscape Management 01326 Dresden, Germany; ²INTEGRAR -Institute of Horticulture Technologies, Schlüterstraße 29, 01277 Dresden, Germany; ³Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Agricultural and Food Sciences, 06120 Halle, Germany

^ascharff@htw-dresden.de

Abstract

Microalgae are considered to be promising production organisms for biomass and specific high value compounds. Currently the commercial use is limited by the yield efficiencies, extraction of sensitive products and high process costs. Intensive research efforts are needed to tap the full potential in the direction of optimized growth parameters and operating conditions. It is well known that the growth of algae is a function created by many factors and light is one of the main influencing parameters. The investigation of different photoperiods is necessary to determine the most efficient regime for an industrial use of microalgae products. The objective of the presented study is the influence of different light/dark regimes (14:10, 16:8, 18:6, 20:8, 22:2, 24:0-h) to enhance biomass production, as well as gaining know-ledge about different growth pattern of investigated species. Both species were grown photoautotroph and in batch mode operated lab scale bubble column photo-bioreactors at 27°C. Results obtained from the study indicated species specific response to different light regimes on growth profile and biomass production. Biomass production was increased with day length to a maximum of 2.70 g/L (24:0) for *C. vulgaris* and 2.56 g/L for *S. obliquus* (24:0).

Keywords: microalgae, photoperiod, light regime, biomass, growth rate

Scharff C., Schroeder F.-G., Domurath N. und Wensch-Dorendorf, M. 2016. Influence of different light irradiation regimes on growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Acta Horticulturae*. 1110: 91–98.

doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1110.14

4.3 Einfluss verschiedener Photoperioden auf das biochemische Profil von *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus*

4.3.1 Kurzfassung der Veröffentlichung

Aufbauend auf die Versuche aus der Veröffentlichung 4 (4.2.2, S. 60) erfolgte die Auswertung des Einflusses verschiedener Tag-Nacht-Regime auf die biochemische Zusammensetzung von *C. vulgaris* und *S. obliquus*.

Untersucht und ausgewertet wurden die Ergebnisse folgender Verbindungen:

- Proteingehalt (photometrisch),
- Carotinoidgehalt (am Beispiel von Lutein, β -Carotin und Astaxanthin mit HPLC),
- Fettsäuren (am Beispiel von Linol- und α -Linolensäure mittels Gaschromatographie und Massenspektrometer) und
- der Chlorophyllgehalt (Chl a und b mittels HPLC).

Die Methodenbeschreibung befindet sich in der Veröffentlichung 3 Kapitel 4.1.2 (S. 51). Die statistische Auswertung erfolgte über linearer Regression unter Nutzung des statistischen Analysenprogrammes SAS.

Die Zellkonzentration von Chl a und b zeigten in beiden Spezies eine z. T. signifikant negative Korrelation mit zunehmender Lichtdauer. Das deutet an, dass die Synthese der Pigmente bei beiden Spezies in gleicher Form durch die Lichtdauer bzw. die Versuchsbedingungen beeinflusst wurde. In beiden Spezies wurden sowohl die höchsten Chlorophyllkonzentrationen als auch das höchste Chl a zu Chl b Verhältnis in den Zellen des 14:10-h Tag-Nacht-Regime erreicht. Ebenfalls konnten die höchsten Zellproteingehalte in Kulturen dieses Tag-Nacht-Regimes nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der produzierten Zellzahl (volumetrischer Gehalt) konnte in *C. vulgaris*-Zellen jedoch der höchste Gehalt an Protein mit Dauerbelichtung erreicht werden. Bei *S. obliquus* dagegen ergab die Umrechnung, dass etwa der gleiche Gehalt an Protein in allen Belichtungsvarianten erzielt wurde. Entsprechend der Auswertung der Lichtenergieeffizienz zeigte sich jedoch, dass die effektivste Herstellung im 14:10-h Regime erfolgte.

Die Auswertung der zwei analysierten Fettsäuren ergab, dass *S. obliquus*-Zellen höhere Gehalte an α -Linolensäure als *C. vulgaris*-Zellen aufwies. Der Linolsäuregehalt unterschied sich weniger und war tendenziell mit Zunahme der Lichtdauer in *C. vulgaris* höher als in *S. obliquus*. Eine signifikante Abhängigkeit dieser Fettsäuren zur Lichtdauer konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch deuten die Korrelationsfaktoren auf eine negative Korrelation der α -Linolensäurekonzentration mit zunehmender Lichtdauer in *C. vulgaris*-Zellen, sowie auf einen Anstieg des Linolsäuregehaltes mit der Zunahme der Lichtdauer in beiden Spezies. Das Verhältnis von Linol- zu α -Linolensäure erhöhte sich in *C. vulgaris*-Zellen mit zunehmender Tagphase von 0,93 auf 1,85. *S. obliquus*-Zellen zeigten ein nahezu unverändertes Fettsäurenverhältnis unabhängig von der Tag-Nacht-Dauer. Die Fettsäuresynthese wurde vermutlich durch Veränderung der Tag-Nacht-Dauer bzw. den Kulturbedingungen mehr in *C. vulgaris* beeinflusst als in *S. obliquus*.

Astaxanthin war das Carotinoid mit dem geringsten Anteil bei beiden Arten. Für die β -Carotinkonzentration konnte eine negative, nicht signifikante, Korrelation mit der Lichtdauer und eine positive, nicht signifikante, Korrelation zum Chl a-Gehalt für beide Spezies gezeigt werden. Dies könnte die Bedeutung von β -Carotin im Lichtsammelkomplex vom Photosystem I und II bekräftigen. Für Lutein, welches in beiden Arten das dominierende Carotinoid war, konnte keine lineare Abhängigkeit zur Lichtdauer nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass *S. obliquus*-Zellen unabhängig von der Tag-Nacht-Dauer größere Zellgehalte von Proteinen, Chl a und Chl b, Lutein, β -Carotin, Astaxanthin und α -Linolsäure im Vergleich zu *C. vulgaris* Zellen aufwiesen. Ein zusätzlicher Einfluss zum Tag-Nacht-Regime kann der Stickstoffmangel verursacht haben, der den Stoffwechsel und damit das biochemische Profil der Zellen beeinflussen kann. Weitere Ursachen für unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen Tag-Nacht-Verhältnisse können nach Grobbelaar et al. (1996) auch der Lichtanpassungsstatus und die unmittelbare Lichtvergangenheit sein. Bezüglich der Lichtnutzungseffizienz und dem volumetrischen Ertrag scheint die Produktion mit dem 14:10-h-Regime am effektivsten mit Ausnahme von Linolsäure bei *C. vulgaris*. Bei *S. obliquus* war die Produktion von Proteinen, Chlorophyll a, Chlorophyll b und Lutein ebenfalls am effektivsten mit dem 14:10-h Regime. Für die Produktion von Fettsäuren ergab sich das 20:4-h und für Astaxanthin und β -Carotin das 16:8-h Regime die höchste Lichtnutzungseffizienz

Die Ergebnisse zeigen, dass mit einer geeigneten Wahl der Lichtdauer Lichtenergie gespart werden kann. Andererseits bestätigen die Ergebnisse auch, dass verschiedene Mikroalgenarten unterschiedlich auf diese Bedingungen bzw. unterschiedliche Tag-Nacht-Regime reagieren (Wijanarko et al. 2004). Weiterhin müssen die Lichtzufuhr- und -dauer, aber auch die Lichtzusammensetzung an die Zellkonzentration angepasst werden (Das et al. 2011). Außerdem entsprechen die für die Produktbildung vorteilhaften Kultivierungsbedingungen nicht immer zu denen für maximales Wachstum und maximalen Biomassertrag (Hu 2007).

4.3.2 Veröffentlichung 5

Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*

C. Scharff^{1,a}, N. Domurath², M. Wensch-Dorendorf³ and F.-G. Schroeder¹

¹University of Applied Sciences Dresden, Faculty for Agriculture/Landscape Management, 01326 Dresden, Germany; ²INTEGAR -Institute of Horticulture Technologies, Schlüterstraße 29, 01277 Dresden, Germany; ³Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Agricultural and Food Sciences, 06120 Halle, Germany

^ascharff@htw-dresden.de

Abstract

Microalgae are photosynthetic plant-like organisms, which are considered to be a fast growing source for a sustainable production of various products (e.g. food and food supplements, biofuels or animal feed and aquaculture). Currently, some of the bottlenecks for the commercial use are the low efficiency of production yields, efficient harvesting technologies for sensitive products and high establishment costs. Light, its quality as well as quantity, is a main critical parameter for microalgal growth and metabolism. Thus, artificial lighting offers the option of improved production of microalgal biomass as well as increases in special metabolites under defined conditions. On the other hand, artificial lighting is a highly expensive factor.

The aim of the present study is to investigate the influence of several photoperiods (14:10-h, 20:4-h, 22:2-h, 24:0-h for *Chlorella vulgaris* and additional 16:8-h, 18:6-h for *Scenedesmus obliquus*) on the biochemical profile of single-celled green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. Preliminary results indicated that *S. obliquus* showed higher cell contents of proteins, chl a and chl b, lutein, β -carotene, astaxanthin and α -linolenic amounts independently from the photoperiod. However, based on the achieved biomass respectively cell concentration in the related photoperiods, the possible harvest yield of these compounds is similar in both species or just little more effective by *S. obliquus*.

Keywords: microalgae, light, protein, fatty acids, carotenoids

Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017b. Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. Acta Horticulturae. 1170: 1149–1156.

doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.148

^a scharff@htw-dresden.de

4.4 Untersuchungen zum Einfluss von UV-Strahlung auf Algenzellen

4.4.1 Ergebnisse Vorversuche

Wachstum

In der Abb. 28 sind die Ergebnisse der Biomasseerträge und Zellzahlen (ZZ) am jeweiligen Versuchsende dargestellt. Mit Ausnahme von Versuch 4 ist eine Reduzierung dieser Parameter in den UV-behandelten Kulturen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erkennbar. Mit UV-B-Strahlung behandelte Zellen wiesen die höchste Reduktion auf (Versuch 2: -41% BTM, -45 % ZZ; Versuch 3: -46 % BTM, -22 % ZZ), während für die UV-A-Strahlung behandelte Zellen eine Reduktion der BTM von 24 % (-14 % ZZ) im Versuch 3, -27 % (-18 % ZZ) im Versuch 2 und -32 % (-25 % ZZ) im Versuch 1 ermittelt wurde.

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Dauer: 264 h, alle Proben: n = 1	Dauer: 264 h, Behandlung: n = 1 Kontrolle: n = 2	Dauer: 264 h, alle Proben: n = 1 zusätzlich CO ₂ in Belüftung	Dauer: 240 h, Behandlung: n = 1 Kontrolle n = 2

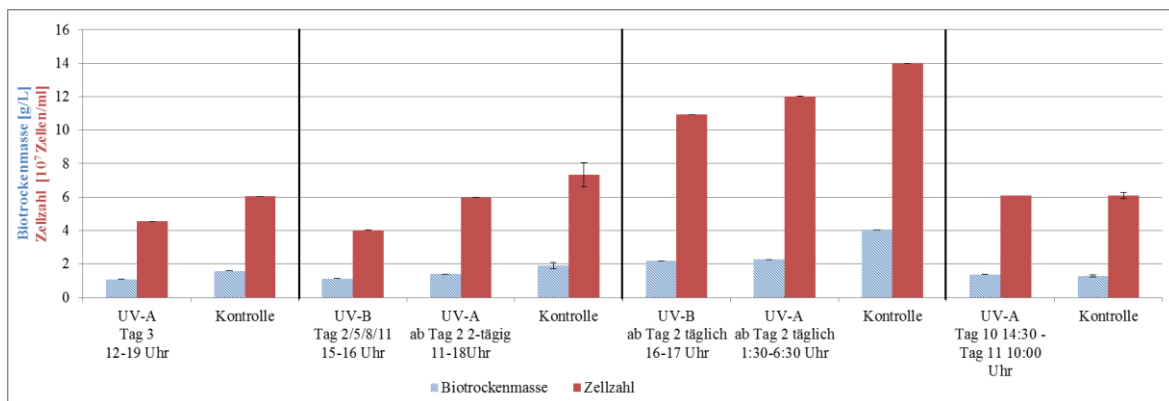


Abb. 28: Biotrockenmasse und Zellzahl für *C. vulgaris* für verschiedene UV-A und UV-B-Behandlungen gegenüber ihrer versuchsinternen Kontrollen am Versuchsende, Tag 1 = Starttag; Balken stellen Standardabweichung dar

Inhaltsstoffe

Die Auswertung und Vergleich der Daten war nur innerhalb des jeweiligen Versuches möglich, da sich die Versuchsbedingungen durch die Versuchsdauer und durch die CO₂-Konzentration in der Begasung unterschieden. Daher ist davon auszugehen, dass diese Abweichungen weitere Effekte verursachten und damit keine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen gegeben ist. Daher wird auf eine detaillierte Auswertung jedes Versuches verzichtet. Im Anhang A 3 (S. 151) befinden sich die Abbildungen zu den Ergebnissen.

Das wesentliche Merkmal in allen Zellen, die eine UV-A oder UV-B-Bestrahlung erhielten, war ein verändertes Fettsäurenmuster. Das heißt, dass in diesen Zellen der jeweilige α -Linolensäuregehalt (ALA) im Vergleich zum Linolsäuregehalt (LA) größer und dadurch das Verhältnis im Vergleich zur jeweiligen Versuchskontrolle gesunken war (Tab. 15).

Tab. 15: Fettsäurenverhältnis nach einer UV-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle

Versuch	Kontrolle	UV-A	UV-B
1	1,61	1,01	-
2	1,35	1,08	1,16
3	1,36	1,28	1,00
4	0,92	0,82	-

Dabei konnten sowohl Zunahmen, als auch abnehmende Konzentrationen der jeweiligen Fettsäuren nachgewiesen werden, die nicht einer spezifischen UV-Bestrahlung zugeordnet werden konnte.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse eine tendenzielle Reduktion des Chlorophyllgehaltes in den Zellen, die UV-A erhielten. In den Zellen von Versuch 1 konnte ein um 40 % reduzierter Chl a und ein um 30 % reduzierter Chl b-Zellgehalt im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. In den Zellen der UV-A-Variante aus Versuch 2 war der Chl a- und b Gehalt um jeweils 24 % im Vergleich zur Kontrolle geringer. Dagegen konnte in Versuch 4 nach der mehrstündigen Bestrahlung über Nacht vor dem Versuchsende kein Unterschied zur Kontrolle gezeigt werden.

Zellen, die mit einer UV-B-Bestrahlung behandelt wurden, wiesen dagegen einen 20 % höheren Chl a und einen 17 % höheren Chl b-Gehalt im Versuch 2 bzw. einen 25 % höheren Chl a und 29 % höheren Chl b-Gehalt im Versuch 3 auf.

Sowohl für die Carotinoide, als auch den Proteingehalt konnte keine Zusammenhänge zur Bestrahlungsart nachgewiesen werden.

Eine statistische Auswertung der Daten war auf Grund der einmaligen Durchführung der Versuche nicht möglich.

4.4.2 Ergebnisse weiterführende Versuche

Die Ergebnisse weiterführender Versuche, die von Weiß (2015) durchgeführt wurden, zeigten bezüglich der Biomasseproduktion keinen (signifikanten) Unterschied zwischen den mit UV-A-Strahlung behandelten Zellen und den Kontrollen. Die Auswertung der Zellzahl und des Chl a-Gehaltes deutete jedoch eine Reduktion durch die UV-A Behandlung an. Dies Bestätigt mit Ausnahme der Ergebnisse der Biotrockenmasse, die Resultate der Vorversuche. Aussagen zum Gehalt weiterer Inhaltsstoffe können nicht gemacht werden, da diesbezüglich keine Analysen erfolgten. Auf Grund der Durchführung in einem anderen Versuchsmodus erfolgte keine weitere Diskussion und Darstellung der Ergebnisse.

4.5 Untersuchungen zum Einfluss von Mikrowellen auf Algenzellen

4.5.1 Ergebnisse Vorversuche

Wie in der Abb. 29 dargestellt wird, zeigte sich anhand der APC-7 Messung durch den Kooperationspartner AFT microwave GmbH eine deutliche Dämpfung im Frequenzbereich zwischen 2 und 3 GHz, sowie bei 6 GHz. Ein Einfluss des Mediums wurde durch Referenzmessungen ausgeschlossen.

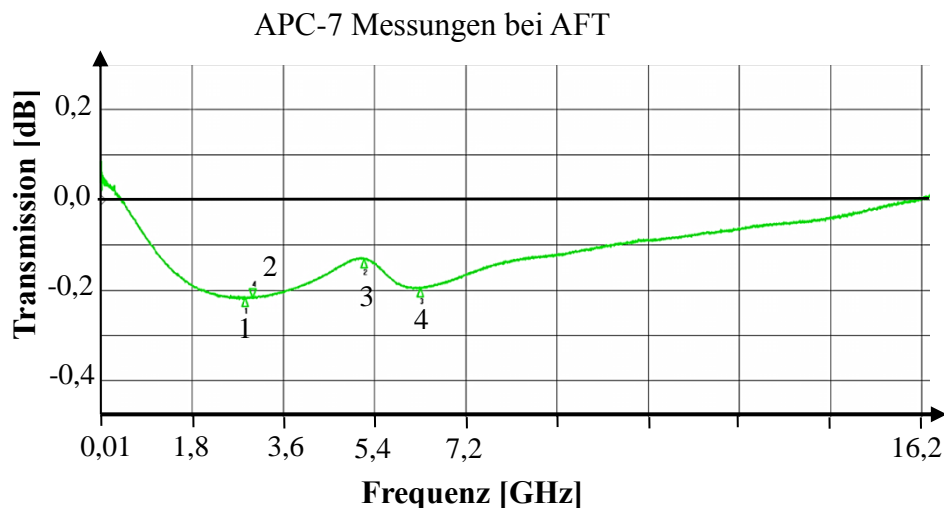


Abb. 29: Darstellung der Absorption durch die Algen (nach Hammer 2012); Untersuchung von 10 MHz bis 18 GHz (dargestellt bis 16,2 GHz); Nummern kennzeichnen Marker, die in Tab. 16 näher erklärt werden

Tab. 16: Marker zur APC-7 Messung

Marker	1	2	3	4
Frequenz [GHz]	2,856	2,998	5,200	6,300

Diese Dämpfung deutete auf eine erhöhte Absorption der Mikrowellenstrahlung durch die Algen, die möglicherweise durch eine Wechselwirkung zwischen den Organismen und der Strahlung verursacht wurde. Daher wurde 2,45 GHz als Arbeitsfrequenz für die Behandlungsanlage (Abb. 16, S. 44) ausgewählt, da es sich auch um ein weltweit verfügbares Frequenzband handelt, welches u. a. in Mikrowellenherden, Funktechniken, Bewegungsmeldern und bei Bluetooth genutzt wird (Gude et al. 2013).

4.5.2 Ergebnisse Hauptversuche

4.5.2.1 Ergebnisse der Mikrowellenbehandlung

Für die Untersuchungen des Einflusses der Mikrowellenbestrahlung auf *C. vulgaris* und *S. obliquus* wurden je zwei Behandlungsschemata (Tab. 9, S. 46) entwickelt. Das Ziel sollte eine Behandlung mit wenig Leistungseintrag darstellen. Auf Grund des Leistungsdrift (siehe Kapitel 3.5.4, S. 44) der Anlage ergaben sich die in der Tab. 17 und Tab. 18 dargestellten Leistungsbereiche für diese Behandlungen.

Tab. 17: Leistungsbereich bei der Behandlung von *C. vulgaris* (Behandlung am Tag 10)

	Wiederholung x Dauer (t_B)	Leistungsbereich (E_B)
Behandlung 1	10 x 30 s + 10 x 15 s	245–460 W
Behandlung 2	15 x 15 s	231–435 W

Tab. 18: Leistungsbereich bei der Behandlung von *S. obliquus* (Behandlung am Tag 4/7/10)

	Wiederholung x Dauer (t_B)	Leistungsbereich (E_B)
Behandlung 1	1 x bis 38°C	270–380 W
Behandlung 2	10 x 15 s	220–350 W

Wachstum

Die Ergebnisse der Biomasseerträge nach 240 h sind in Abb. 30A-B dargestellt. Es zeigte sich für beide Spezies sowohl für den Biomasseertrag, als auch die Zellzahl, keine Unterschiede zwischen den unbehandelten Zellen und den mit Mikrowellen behandelten Zellen.

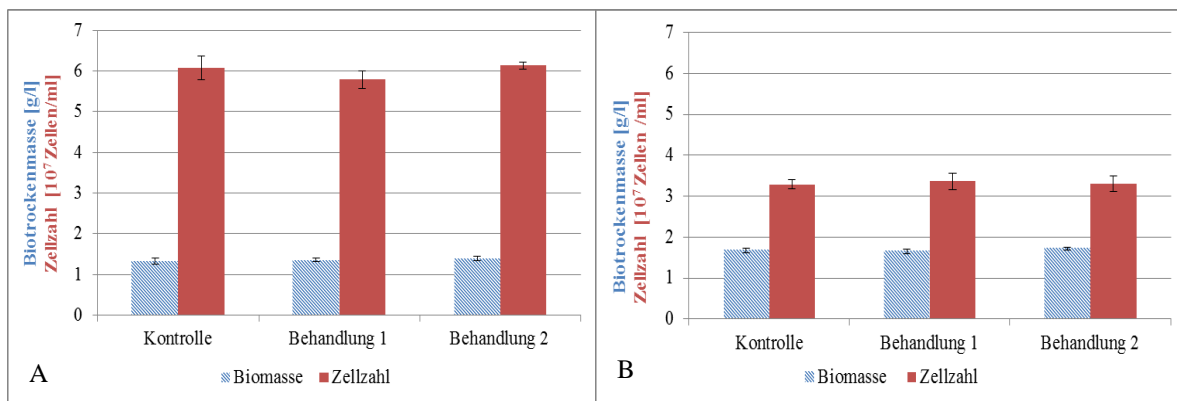


Abb. 30A-B: Biomasseertrag und Zellzahl bei *C. vulgaris* (A) (Behandlung 1: 10 x 30 s + 10 x 15 s, Behandlung 2: 15 x 15 s am Tag 10) und *S. obliquus* (B) (Behandlung 1: 1x bis 38°C, Behandlung 2: 10 x 15 s am Tag 4/7/10) nach 240 h; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2)

Inhaltsstoffe:

Die Auswertung der Ergebnisse hat gezeigt, dass keine Unterschiede sowohl zwischen den Behandlungen, als auch zur Kontrolle nachweisbar waren. Entsprechend der vergleichbaren Ergebnisse der Zellzahlen und Biomasseerträge, konnten auch keine Unterschiede für den zellulären und volumetrischen Ertrag erreicht werden. Die Abbildungen der Ergebnisse befinden sich im Anhang A 4 (S. 152).

Versuche mit *C. vulgaris*, die einer Mikrowellenbehandlung ausgesetzt waren, wiesen vereinzelt am Tag der Ernte visuelle Aufschluserscheinungen auf. Dies zeigte sich durch einen grünlichen Überstand über dem Pellet nach der Zentrifugation. Diese Veränderungen waren in unterschiedlicher Ausprägung (Intensität der Farbe des Überstandes) und konnten nicht quantitativ durch Auszählung der Zellzahl als Maß für den Zellaufbruch erfasst und keinem konkretem Behandlungsschema bzw. einem Behandlungsparameter zugeordnet werden.

Ein Einfluss durch die Pumpe wurde durch Referenzversuche ohne Mikrowellenbestrahlung nicht nachgewiesen. Diese Versuche wurden nicht zur Auswertung verwendet. *S. obliquus*-Zellen zeigten keine Zellaufbrucherscheinungen.

Auswertung des Energieeintrages:

Es sollte weiterhin untersucht werden, wie die Mikrowellenenergie in den Zellen bzw. in der Algensuspension absorbiert wird. Dazu wurden die die Versuche hinsichtlich der gemessenen und der theoretischen Erwärmung ausgewertet. Die Auswertung der Daten zeigte, dass während der gepulsten Behandlung der Algen im Applikator der Anlage, in Abhängigkeit von der eingestellten Leistung (E_B) und der Behandlungszeit (t_B), kurzzeitig eine theoretische Temperaturerhöhung von 0,7–1,7 K (ΔT_{theo}) stattfand. Bei einer 15 sekundigen Behandlung wurden 50 % der Algensuspension (1 l) behandelt. Nach der Behandlung konnte in der Algensuspension eine Temperaturerhöhung um 0,5 K (ΔT_{prakt}) nachgewiesen werden. Somit wurde bereits ein Großteil (40–60 %) der entstandenen Wärme an die Umgebung beim Transport bzw. an die unbehandelte, temperierte Suspension im Kolben abgegeben. Bei einer 30 sekundigen Behandlung wurde das gesamte Volumen einmal vollständig durch die Anlage geleitet und bestrahlt. Für diese Behandlungszeit konnte gezeigt werden, dass die gesamte Wärme an die Suspension übertragen wurde, und die gemessene Temperaturänderung dem theoretischen Wärmeeintrag entsprach. Die 5 minütigen Pausen zwischen den einzelnen Behandlungen ermöglichten eine Absenkung der Temperatur an die Ausgangstemperatur. Insgesamt ergab sich so eine maximale Erhöhung der Temperatur von 1,5 K nach 15 Wiederholungen.

Zur weiteren Auswertung wurde das Verhältnis vom theoretisch eingetragenen Wärmeeintrag durch die Mikrowelle (ΔT_{theo}) zu dem tatsächlich gemessenen Temperaturwert (ΔT_{prak}) bestimmt und auf den theoretischen Wärmeeintrag normiert (Abb. 31 und Abb. 32). Dies erfolgte unter der Annahme, dass bei gleichen Behandlungsbedingungen die gleiche Abkühlung beim Durchfluss durch das System stattfand.

Für die Berechnung des Energieeintrages durch die Mikrowellenbehandlung in die Zellen wurden folgende Formeln verwendet:

Zykluszeit t_Z :

$$t_Z [s] = (V \cdot 60) \cdot P_P^{-1} \rightarrow \text{Zeit, um vorhandenes Volumen einmal vollständig zu behandeln}$$

V [l]: vorhandenes Volumen im Reaktor

P_P : Pumpleistung, 4 l·min⁻¹

Wiederholung W_B :

$$W_B = (P_P \cdot 60 \cdot t_B) \cdot V^{-1} \text{ Häufigkeit der Behandlung/des Zyklus des V[l] während } t_B$$

t_B : Dauer der Behandlung [s] (15–30 sec)

Energieeintrag pro Zyklus E_Z :

$$E_Z [Ws] = t_Z \cdot E_B$$

E_B [W]: Angabe am Schaltnetzteil (bzw. Mittelwert über t_B bei Dauerbehandlung), Leistung pro Behandlung

Wärmemenge Q:

$$Q \text{ [Ws]} = c_w \cdot \Delta T_{\text{prakt}} \cdot V$$

$c_w = 4180 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$: Wärmekapazität Wasser (bei 24°C), $1 \text{ J} = 1 \text{ Ws}$

$\Delta T_{\text{prakt}} \text{ [K]}$: gemessene Temperaturänderung während der Behandlung

Vereinfacht unter der Annahme, dass $1 \text{ l} = 1 \text{ kg}$ entspricht und die Mikroalgen zu dem Versuchszeitpunkt keinen relevanten Einfluss auf die Dichte bewirken (Dichte von Wasser = 1 g/cm^3)

Theoretische Erwärmung ΔT_{theo} :

$$\Delta T_{\text{theo}} \text{ [K]} = E_z \cdot W_B \cdot c_w^{-1} \cdot V^{-1}$$

Normierung der Temperaturdifferenz:

$$\Delta T \text{ [K]} = (\Delta T_{\text{theo}} \cdot \Delta T_{\text{prakt}}^{-1}) \cdot \Delta T_{\text{theo}}^{-1}$$

Die Abb. 31 und Abb. 32 stellen den normierten Wärmeeintrag als Beispiel für die gepulste Behandlung von *C. vulgaris* und *S. obliquus* dar.

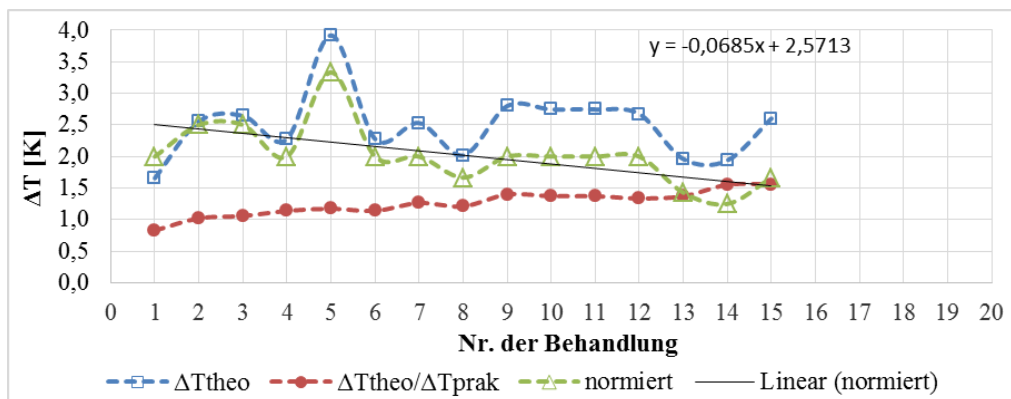


Abb. 31: Normierung des Wärmeeintrages in *C. vulgaris* (Behandlung 2: 15 x 15 s)

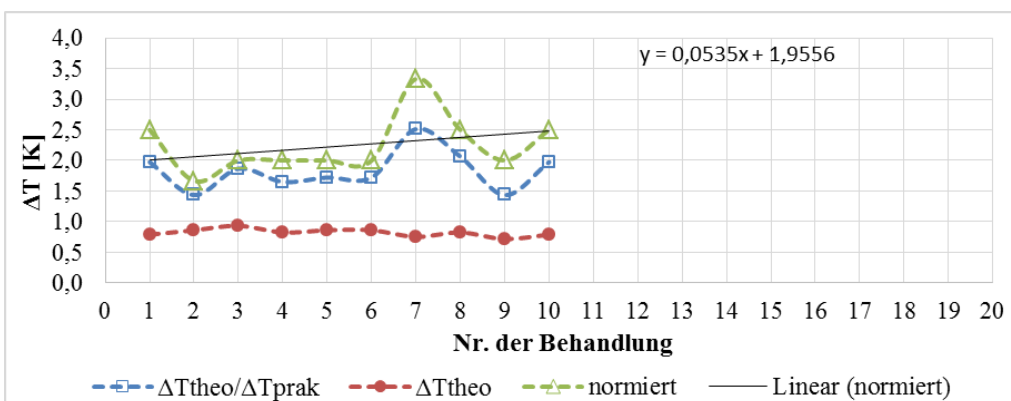


Abb. 32: Normierung des Wärmeeintrages in *S. obliquus* (Behandlung 2: 10 x 15 s)

Die Nummer der Behandlung entspricht dabei einer einzelnen Behandlung, die in Abständen von 5 Minuten erfolgte Die Abbildungen zeigen für die Behandlung von *C. vulgaris* ein Absinken des Wärmeeintrages mit Zunahme der Anzahl der Behandlungen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen weniger Energie mit der Zeit aufnehmen. Dies kann auf einen Schutzmechanismus der Zellen hinweisen.

Dagegen zeigt die Normierung des Wärmeeintrages von *S. obliquus* einen Anstieg. Dies deutet auf eine zunehmende Aufnahme der Wärmeenergie und damit auf eine erhöhte Absorption der Mikrowellenenergie mit der Häufigkeit der Behandlungen hin.

4.5.2.2 Hochauflösende Temperaturmessung

Auf Grund der Temperaturmessung mit dem Datenlogger Testo 177-T4 war eine zeitauflösende Temperaturmessung im Abstand von 3 sec mit einer Messgenauigkeit von 0,5 % vom Messwert möglich. Damit konnte nur eine punktuelle und nicht dynamische, also zeitaufgelöste, Temperaturbestimmung erfolgen. Um die Temperaturverteilung in der Algensuspension mit einer hohen lokalen Auflösung ($\sim 2 \mu\text{m}$) und einer Zeitauflösung im Millisekundenbereich zu bestimmen, wurden im Rahmen des Forschungsprojektes „Nutzung einer Mikrowellenmodifikation an Algen für neue Applikationsfelder“ (Förderkennzeichen: KF2223306MD1) mit der Fa. InfraTec entsprechende Untersuchungen zur hochauflösenden Temperaturmessung durchgeführt. Ziel der Versuche war es, Temperaturinhomogenitäten an Algenzellen während bzw. kurz nach der elektromagnetischen Bestrahlung dynamisch nachzuweisen. Dabei sollte das dynamische Temperaturverhalten im Medium und in der Zelle durch die Mikrowellenbestrahlung untersucht werden.

Dafür wurde eine Infrarotkamera (IR-Kamera) der Serie 8312500 von der Firma InfraTec mit folgenden Parametern genutzt.

- Mikroskop: 3x
- Mikroskop. Sensorgröße: 640 x 512
- Wellenlänge: 4 μm
- Empfindlichkeit: 20 mK
- Bildrate: 300 Hz

Damit konnte eine geometrische Auflösung von 5 μm erreicht werden.

Es wurde eine experimentelle Versuchsanordnung aufgebaut, bei der sich die Messkammer mit einem Saphirfenster kurz nach dem Ausgang der Mikrowellenanlage befand. Durch das Saphirfenster wird eine hohe Transmission (90 %) für Infrarotstrahlung gewährleistet. Die Algen wurden aus dem Kultivierungskolben, durch die Mikrowellenanlage und anschließend durch die Messkammer mit einer Pumpleistung von 4 l/min gepumpt. In der Abb. 33A-B ist der Aufbau der IR-Kamera und die Ankopplung an die Mikrowellenanlage dargestellt.

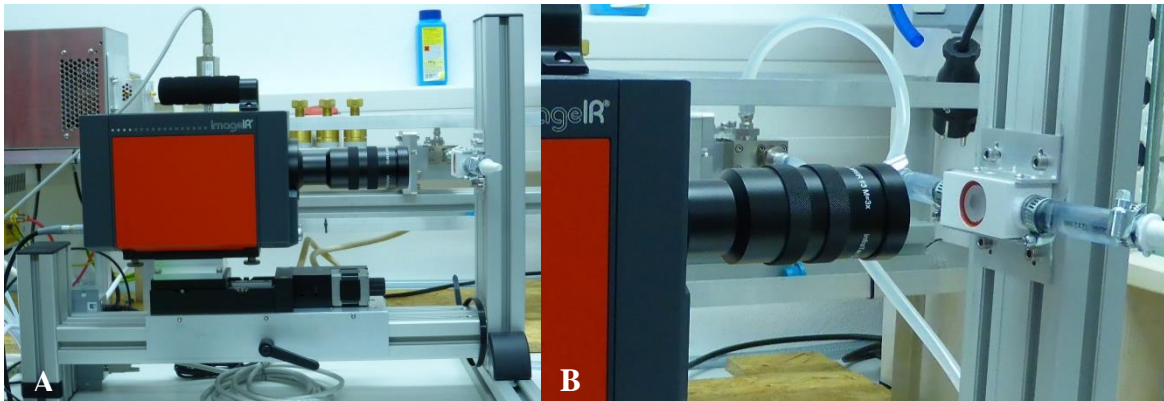


Abb. 33A-B: Experimentelle Versuchsanordnung der IR-Kamera (A) und Ankopplung an die Versuchsanlage (B)

Es konnte gezeigt werden, dass die Mikrowellenstrahlung die IR-Messung nicht beeinflusst.

Bestimmung der dynamischen Temperaturänderung

Zur Bestimmung der dynamischen Temperaturänderung wurden die Proben über einen Zeitraum von 60 sec mit 200 W und 1200 W Mikrowellenleistung bestrahlt. Die Temperatur wurde mit einer Messrate von 25 Hz gemessen. Dabei zeigte sich zwischen 15 und 55 Sekunden Messzeit ein linearer Anstieg (Abb. 34A-B) von 0,026 K/sec und bei 1200 W 0,108 K/sec.

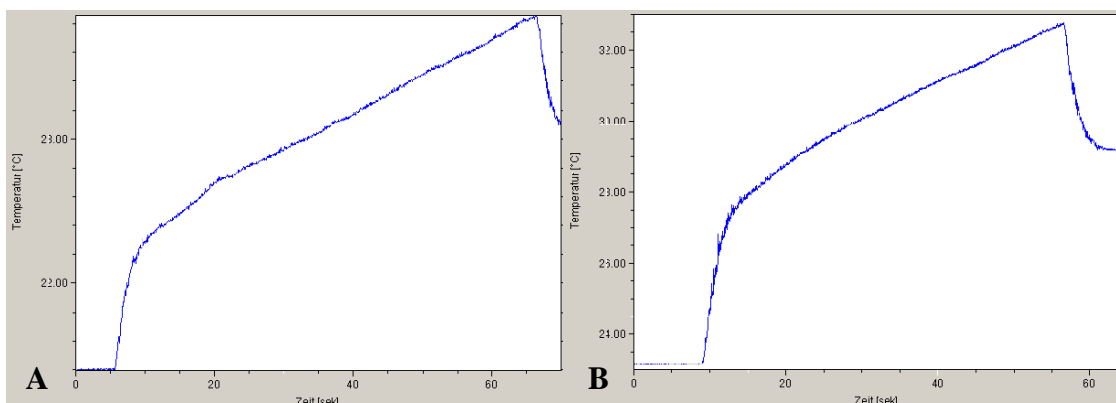


Abb. 34A-B: Temperaturänderung bei einer Mikrowellenleistung von 200 W (A) und 1200 W (B) (Höpfner 2014)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Temperaturerhöhung nicht proportional zur Leistung war, da die Temperaturerhöhung nicht um das 6-fache stieg. Dies wird auf einen geringeren Übertragungsgrad der Mikrowellenleistung bei größeren Leistungseinträgen zurückgeführt.

Damit konnte gezeigt werden, dass der dynamische Temperaturverlauf in der Algen-suspension mit einer Auflösung von 0,02 K dargestellt werden kann. Der Versuchsaufbau ist somit geeignet, eine dynamisch hochauflösende Temperaturmessung in einem engen zeitlichen Verhältnis zur Algenbestrahlung durchzuführen.

Lokale Temperaturbestimmung

Mit der experimentellen Messanordnung (Abb. 33A) wurde weiterhin untersucht, inwieweit die Temperaturverteilung bzw. Temperaturunterschiede in den Algenzellen bestimmbar sind.

Die Ergebnisse der Messungen haben gezeigt, dass es nicht möglich war, die Temperaturverteilung in einer einzelnen Algenzelle beim Durchfluss durch die Messkammer zu erfassen. Als Ursache wird eine zu geringe Vergrößerung mit einer Auflösung von 5 µm, eine Dämpfung der IR-Strahlung und ein ungünstiger IR-Wellenlängenbereich für das Medium Wasser angenommen. Mit einer höheren Vergrößerung eines 8-fachen Mikroskopes könnte nach Höpfner (2014) eine bessere Auflösung erreicht werden. Daher sollten die Untersuchungen zu lokal hochauflösenden Temperaturmessungen an Zellen darauf aufbauend weitergeführt werden, da diese Messmethode auch von hohem wissenschaftlichem Interesse ist.

4.6 Ergebnisse mit zusätzlich CO₂

Die Ergebnisse für die Biomasse und Zellzahl sind in der Abb. 35 dargestellt. Die Versuche mit einem Anteil von 0,75 % CO₂ in der Belüftung erfolgten im Anschluss an den Steigerungsversuch und mit einem Versuchstag weniger. Dadurch kann ein anderer physiologischer Status für die Zellen, wie z. B. Alter der Zellen, Verfügbarkeit von Nährstoffen und Licht, vorliegen. Daher wurden diese in dieser Auswertung nicht in den konkreten Vergleich einbezogen und nur grafisch dargestellt.

Wachstum

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kultur mit der höchsten CO₂-Zufuhr eine maximale Zunahme des Biomasseertrages von ca. 200 % und eine maximale Zunahme um 98 % der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle aufwies.

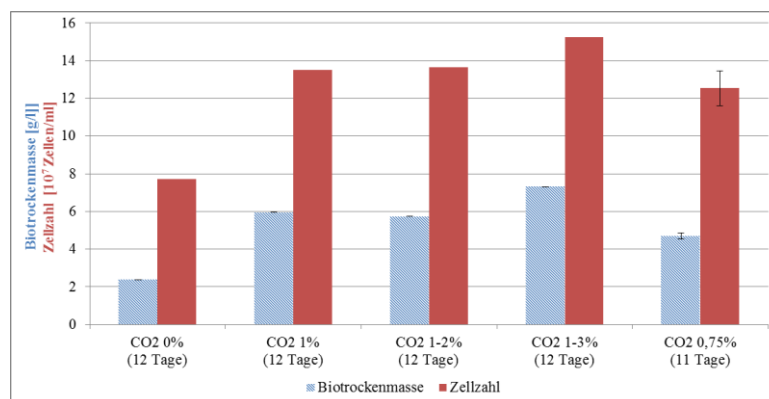


Abb. 35: Biomasseertrag und Zellzahl von *C. vulgaris* bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Begasung nach 264 h (12 Tage) bzw. 240 h (11 Tage); Balken stellen Standardabweichung dar, n = 1 außer CO₂, 075%: n = 3)

Inhaltsstoffe:

Die Ergebnisse der relativen Anteile der untersuchten Inhaltsstoffe sind im Anhang A 5 (S. 153) dargestellt.

Die Auswertung der Inhaltsstoffe ergab, dass der Proteinanteil in den Zellen durch die CO₂-Gabe von ca. 35 % auf ca. 10 % sank, was einer absoluten Reduktion von 70–75 % in den Zellen entsprach. Bei den Fettsäuren ergab sich eine Verschiebung des LA/ALA-Verhältnisses. In Zellen, die mit zusätzlich CO₂-angereicherter Luft behandelt wurden, erhöhte sich die LA-Konzentration in den Zellen um bis zu 166 %. Der ALA-Anteil reduzierte sich dagegen um 5 bis maximal 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Zellen, die mit zusätzlich CO₂ angereicherter Luft begast wurden, wiesen eine Reduktion der Carotinoidkonzentration auf. Dabei wurde im Vergleich zur Kontrolle eine ca. 60 % geringere β -Carotin- und Luteinkonzentration sowie eine um 40–50 % geringere Astaxanthinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Sowohl der relative wie absolute Chlorophyllgehalt wies in den mit CO₂-angereicherter Luft begasten Zellen einen 60–70 % geringere Konzentration im Vergleich zur Kontrolle auf. Weiterhin konnte eine deutliche Gelbfärbung der Kulturen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 36).

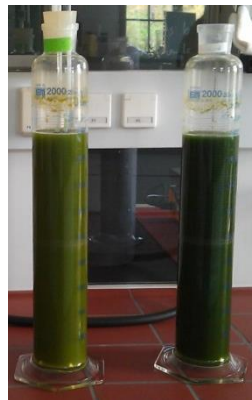


Abb. 36: Gelbfärbung der *C. vulgaris*-Kultur nach 264 h, links + 1% CO₂, rechts: mit CO₂ aus Umgebungsluft

Die Versuche mit zusätzlich CO₂ wurden durchgeführt, um einem Anstieg des pH-Wertes durch die Zunahme der Zellzahl entgegen zu wirken, da dieser sich z. T. über dem spezies-spezifischen Optimum lag und ein Einfluss auf die Behandlung nicht ausgeschlossen werden konnte. In Abb. 37 ist der Vergleich der pH-Wert-Entwicklung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit und im Vergleich mit zusätzlich 0,75 % CO₂ bei einem Tag-Nacht-Regime von 14:10-h in der Belüftung für *C. vulgaris* grafisch dargestellt.

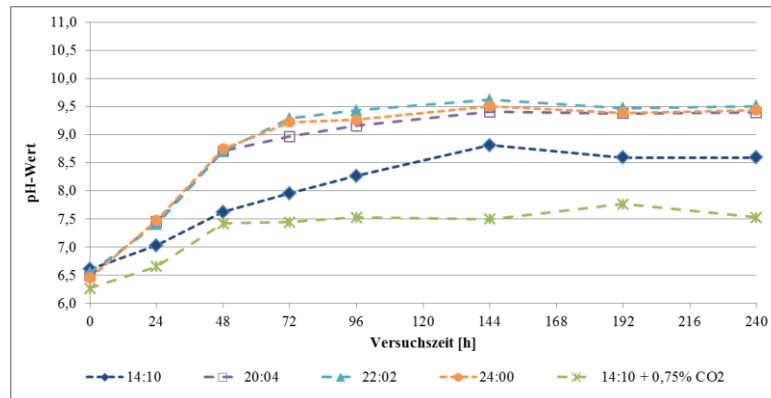


Abb. 37: Vergleich der pH-Wert Entwicklung in Abhängigkeit von der Lichtdauer bzw. durch eine erhöhte CO₂-Konzentration von 0,75 % am Beispiel von *C. vulgaris* zum Probenahmezeitpunkt

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass durch die Zuführung von CO₂ der pH-Wert nach 48 h auf 7,5 stieg und sich bei diesem Wert bis zum Ende stabilisierte. Dabei zeigten sich auch keine Veränderungen während der Tagphase. Weiterhin ist auch die unterschiedliche pH-Wert Entwicklung in Abhängigkeit von der Photoperiode zu erkennen. Kulturen mit einer Photoperiode von 14 h wiesen den geringsten Anstieg des pH-Wertes auf. Kulturen, die mit einer Belichtungsdauer ab 20 h behandelt wurden wiesen bereits 24 h nach Versuchsbeginn einen signifikant höheren pH-Wert als die Kulturen mit einer Belichtungsdauer von 14 h auf. Der pH-Wert stabilisierte sich zum Probenahmezeitpunkt auf 9,5.

4.7 Ergebnisse mit zusätzlich Nitrat

In den Abbildungen Abb. 38A-B und Abb. 39 sind die Ergebnisse der Nitrat-Variante im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

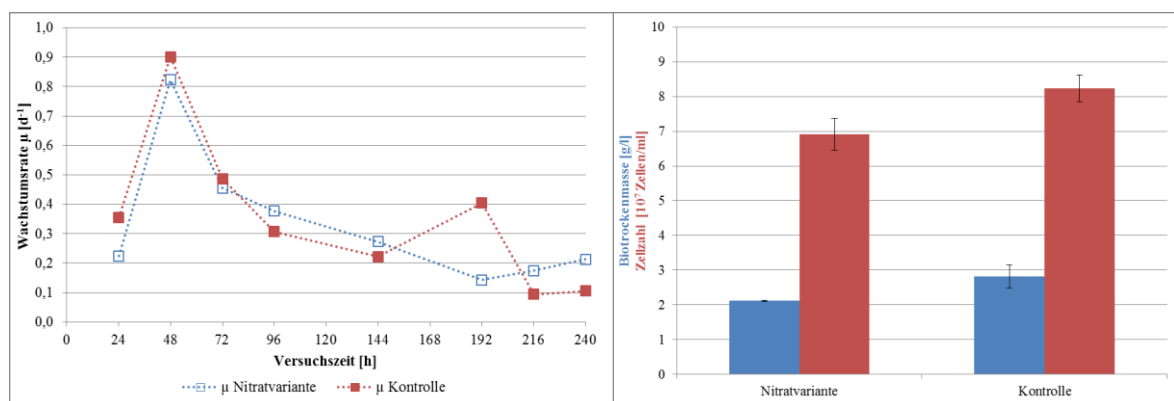


Abb. 38A-B: Vergleich der Wachstumsraten (A) und der Biotrockenmasse und Zellzahl (B) nach 240 h von *C. vulgaris* zwischen der Nitratvariante und der Kontrolle; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2

Die Auswertung des Nitratversuches in Bezug auf die Wachstumsrate und das Wachstumsprofil zeigt im Vergleich zur Kontrollvariante mit der gleichen Photoperiode ein geringfügig abweichendes Profil bis 144 h. Dabei zeigten die Zellen der Kontrolle mit dem Standardmedium höhere Wachstumsraten als Zellen der Nitrat-Variante.

Die maximale Wachstumsrate wurde in beiden Varianten nach 48 h mit $\mu_{\max\text{-Nitrat}} = 0,82 \text{ d}^{-1}$ und $\mu_{\max\text{-Kontrolle}} = 0,90 \text{ d}^{-1}$ erreicht und sank anschließend. Die Zellen der Kontrollen zeigten zwischen 144 und 192 h eine Verdopplung der Wachstumsrate. Die Wachstumsrate reduzierte sich nach 192 h wieder auf $0,1 \text{ d}^{-1}$. Die Wachstumsrate der Nitrat-Variante sank nach dem Maximum kontinuierlich und stieg nach 192 h bis zum Versuchsende wieder leicht an. Messungen des Nitratwertes ergaben, dass in der Kontrolle zwischen 120 und 144 h Nitrat aufgebraucht war, während in den zwei Kulturen der Nitrat-Variante noch $77 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_3$ nachweisbar war. Im Vergleich zu den durchgeführten Kontrollvarianten waren die Zellzahl in der Nitrat-Variante im Mittel um 16 % und der Biomassertrag um ca. 26 % geringer. Weiterhin waren die Zellen nach 192 h ca. 12 % größer im Vergleich zur Kontrolle.

Die Entwicklung des zellulären Chl-a-Gehaltes wies in den ersten 96 h einen ähnlichen Verlauf zwischen beiden Varianten auf. In beiden Spezies wurde dabei eine maximale Chl a-Konzentration nach 24 h nachgewiesen. Im Anschluss sank in beiden Varianten der Chl a-Gehalt bis ca. 96 h (120 h in der Kontrolle) nach Versuchsbeginn. Die Zellen der Nitrat-Varianten zeigten zwischen 96 und 192 h einen erneuten Anstieg und anschließend eine Verringerung des Chl a-Gehaltes in den Zellen bis zum Versuchsende. In den Kontrollen reduzierte sich dagegen der Chl a-Gehalt nach 120 h bis zum Ende des Versuches.

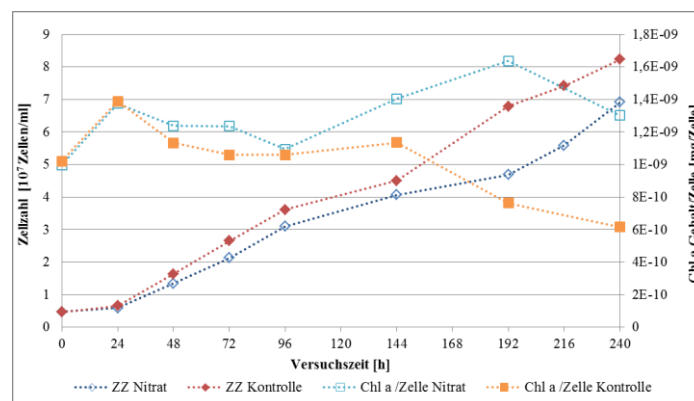


Abb. 39: Zeitliche Entwicklung der Zellzahl und der zellulären Chl a-Konzentration in der Nitratvariante im Vergleich zur Kontrolle von *C. vulgaris*, Balken symbolisieren Standardabweichung, n = 2

In Tab. 19 sind die Unterschiede der relativen Gehalte aus gefriergetrockneten Proben gegenübergestellt. Mit Ausnahme des ALA- und Astaxanthingehaltes konnte eine Zunahme der analysierten Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Das Zellgewicht der Zellen aus der Nitrat-Variante war im Mittel um 8 % geringer.

Tab. 19: Ergebnisse der Analyse aus gefriergetrockneten Proben des Nitratversuches im Vergleich zur Versuchskontrolle (\pm entspricht der Standardabweichung, %_{rel} bzw. %_{abs} entspricht der Abweichung zum relativen Gehalt bzw. zur absoluten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, n = 2)

Variante	Nitrat	Kontrolle	[%_{rel}]	[%_{abs}]
Parameter	g·100 g⁻¹	g·100 g⁻¹		
Protein	64,33 ± 0,04	28,05 ± 1,20	129	106
LA	3,82 ± 0,06	2,20 ± 0,20	74	55
ALA	1,24 ± 0,07	1,23 ± 0,15	1	-5
β-Carotin	0,15 ± 0,00	0,06 ± 0,00	150	124
Lutein	0,44 ± 0,01	0,30 ± 0,01	47	32
Asta	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0	-10
Chl a	3,41 ± 0,04	1,48 ± 0,07	130	107
Chl b	1,22 ± 0,01	0,55 ± 0,04	122	101

4.8 Ergebnisse und Diskussion der REM Untersuchungen

4.8.1 Ergebnisse der REM-Untersuchungen

Die REM-Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Oberflächenmorphologie der Algenzellen mit einer hohen Auflösung und Tiefenschärfe auch in Abhängigkeit der Behandlung darzustellen. Zudem sollte die Elementverteilung in den Algen in Abhängigkeit der Behandlung und Spezies erfasst werden. Die Aufnahmen wurden durch eine Beschleunigungsspannung von 3 keV mit verschiedenen Vergrößerungen erstellt. Ausgewählte Proben (Tab. 20) von verschiedenen Versuchen wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Proben waren gefriergetrocknet und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

Tab. 20: Proben- und Versuchsauswahl für REM-Untersuchungen

Probenbezeichnung	Algenart	Tag-Nacht-Regime [h] (Lichtquelle)
C.v.1	<i>C. vulgaris</i>	14:10 (FL)
C.v.2	<i>C. vulgaris</i>	20:4 (LED)
C.v.3	<i>C. vulgaris</i>	22:2 (FL)
C.v.4	<i>C. vulgaris</i>	24:0 (FL)
S.o.1	<i>S. obliquus</i>	18:6 (FL)
S.o.2	<i>S. obliquus</i>	24:0 (FL)

Chlorella vulgaris

In Abb. 40A-B sind beispielhaft *C. vulgaris*-Zellen aus einem Versuch mit einem 20:4-h Tag-Nacht-Regime mit zwei verschiedenen Auflösungen dargestellt.

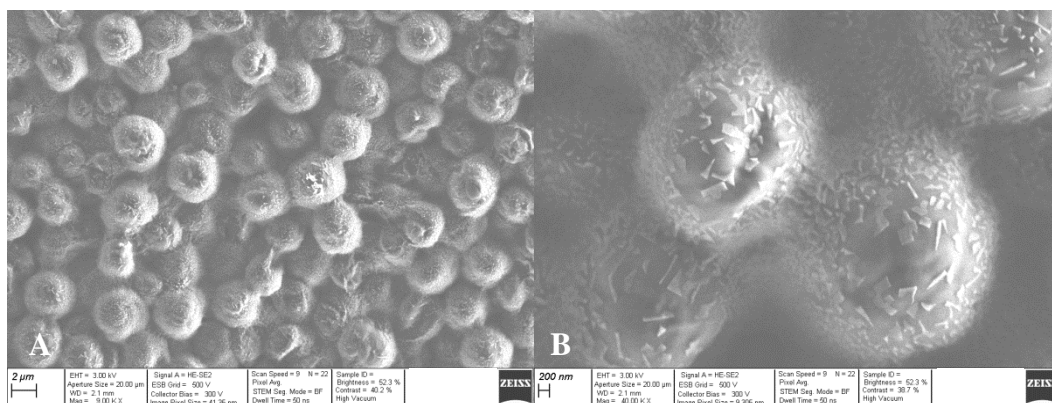


Abb. 40A-B: REM-Aufnahme der Probe C.v.2, Maßstab 2 µm (A) und 200 nm (B) (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150)

Die Abbildungen zeigen die charakteristische kugelige Struktur der *C. vulgaris*-Zellen. Der Durchmesser der gefriergetrockneten Zellen beträgt ca. 2 µm. In Abb. 41A-D befinden sich weitere Abbildungen von *C. vulgaris*-Zellen von Versuchen mit unterschiedlichen Photoperioden bzw. Lichtquellen.

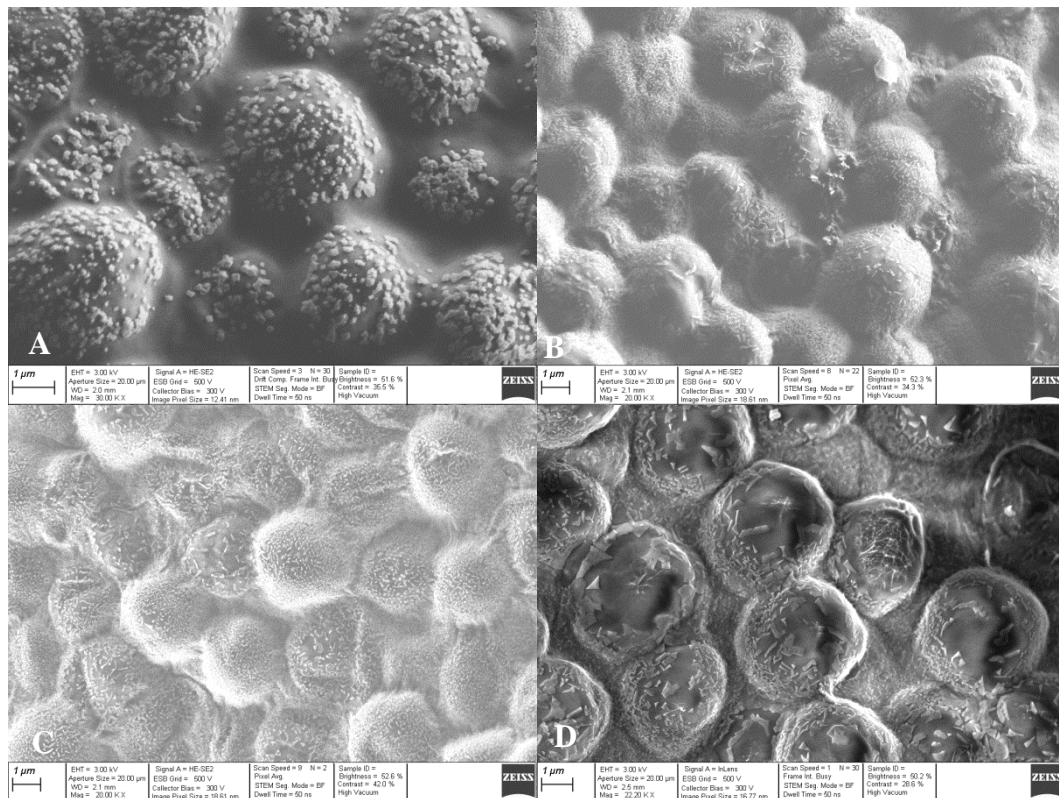


Abb. 41A-D: REM-Aufnahmen von *C. vulgaris*-Zellen aus Versuchen mit verschiedenen Photoperioden bzw. Lichtquellen (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150, Maßstab: 1 µm, A: C.v.1, B: C.v.2, C: C.v.3, D: C.v.4)

Verschiedene Bildausschnitte von REM-Aufnahmen wurden verwendet, um die Elementverteilung charakterisieren zu können. Dafür wurden die mit dem EDX-Detektorsystem aufgenommenen Spektren dieser Bildausschnitte ausgewertet. In der Abb. 42A befindet sich beispielhaft eine analysierte Fläche von *C. vulgaris*-Zellen aus der Probe C.v.2. In Abb. 42B befindet sich das entsprechende Spektrum der Elementverteilung.

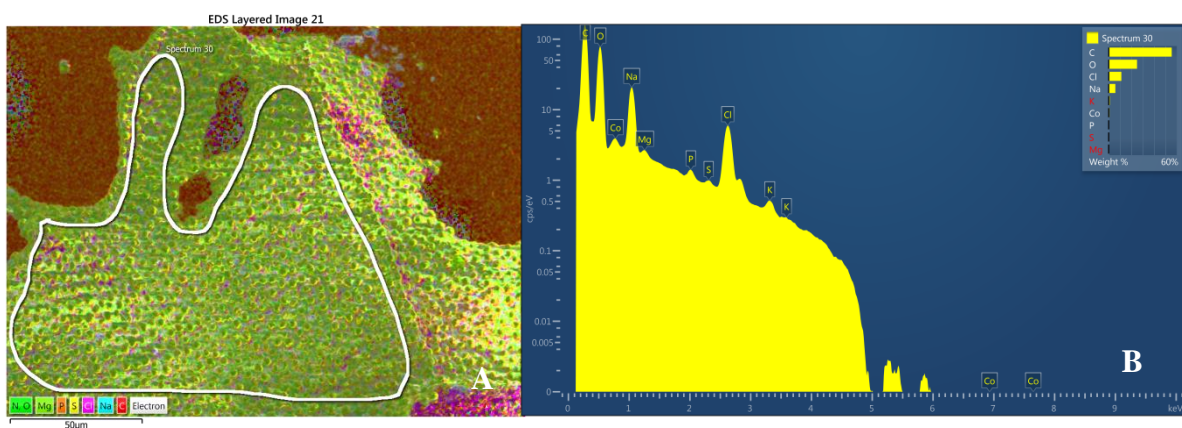
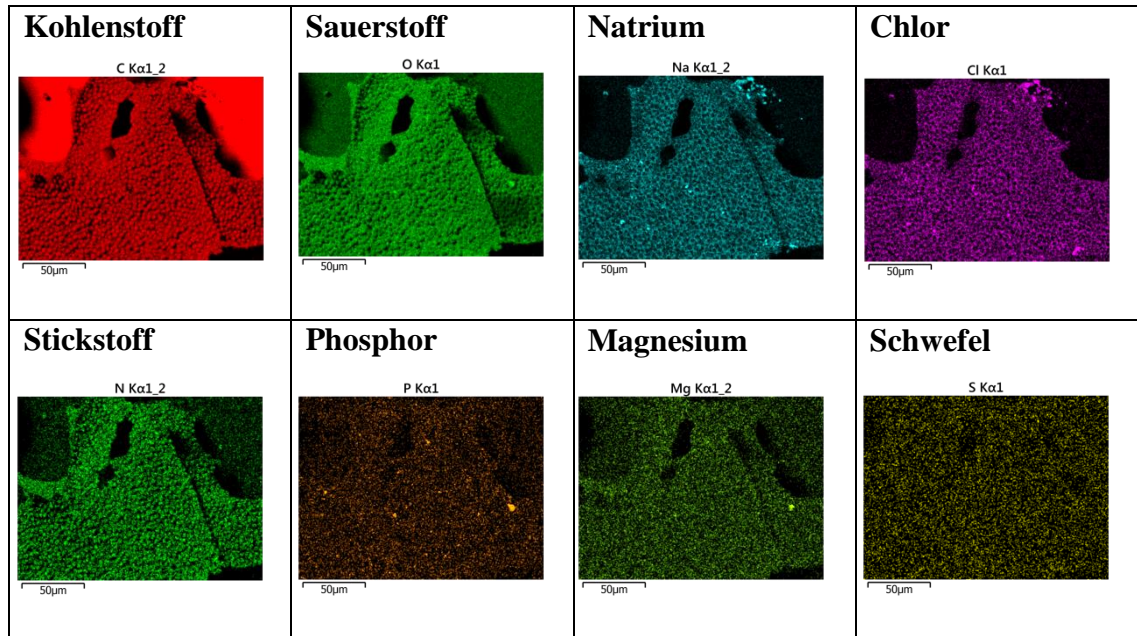


Abb. 42A-B: Ausgewählte Fläche für die Elementanalyse aus einer Probe von *C. vulgaris* (C.v.2) (A); Spektrum der Elementanalyse für diesen Bildausschnitt (B)

In der Abb. 43 sind die Flächenanalysen einzelner Elemente für den Bildausschnitt von Abb. 42A dargestellt.

Abb. 43: Flächenanalyse einzelner Elemente (EDX-Analyse) von *C. vulgaris* für den Bildausschnitt von Abb. 42A mit einem Maßstab von 50 µm



Wie aus den Flächenanalysen von Abb. 43 hervorgeht, ist die Verteilung der untersuchten Elemente über der ausgewählten Fläche relativ gleichmäßig. Signifikante lokale Konzentrationen konnten im Übersichtsbild nicht gefunden werden. In der Tab. 21 befindet sich die durchschnittliche Elementverteilung für jede Probe.

Tab. 21: Durchschnittliche Elementverteilung in % für *C. vulgaris*-Zellen (n. b. = nicht bestimmbar)

Element	Probe			
	C.v.1	C.v.2	C.v.3	C.v.4
Kohlenstoff	51,30	55,57	57,34	31,30
Sauerstoff	30,50	24,99	19,71	11,88
Natrium	7,37	5,89	6,99	15,61
Chlor	9,29	11,18	11,06	40,05
Stickstoff	n. b.	n. b.	2,92	n. b.
Phosphor	0,38	0,35	0,57	0,21
Magnesium	0,29	0,16	0,25	0,13
Schwefel	0,19	0,21	0,25	0,22
Kobalt	0,65	0,70	0,39	n. b.
Kalium	n. b.	0,94	0,53	n. b.

Eine behandlungsspezifische Verteilung der Elemente konnte nicht nachgewiesen werden. Auffällig war der Kobaltanteil in den Proben mit Ausnahme von C.v.4. Hinzu kam ein unregelmäßiger Belag über den Zellen, der die weitere Auswertung der Elementverteilung störte. Verschiedene Bildausschnitte einer Probe ergaben daher unterschiedliche Verteilungen der Elemente.

Scenedesmus obliquus

Die Abb. 44A-B zeigt REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten *S. obliquus*-Zellen.

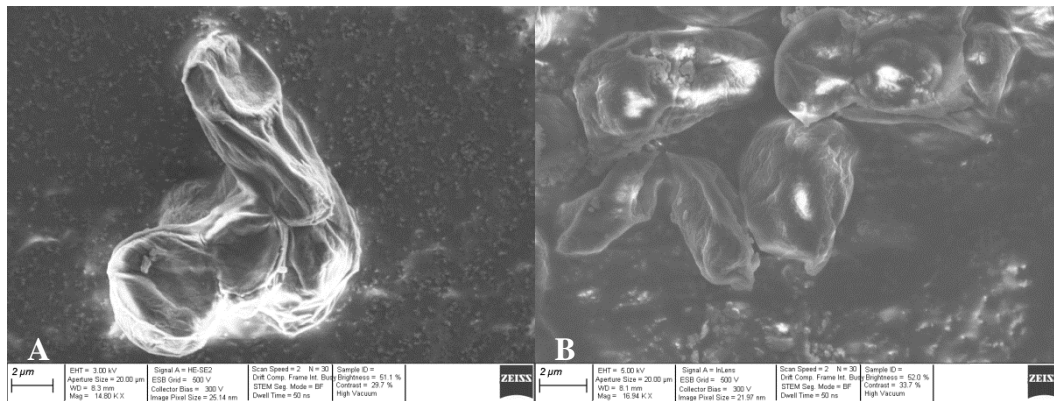


Abb. 44A-B: REM-Aufnahmen von *S. obliquus*-Zellen (REM-Mikroskop: Gemini 500 (Zeiss), EDX-System X-MAXn 150, A: 18:6-h, B: 24:0-h

Im Vergleich zu den kugligen *C. vulgaris*-Zellen, ist die charakteristisch, längliche Struktur von *S. obliquus*-Zellen zu erkennen. Bedingt durch die Gefriertrocknung zeigt sich eine eingefallene Oberflächenstruktur. Die Größe der getrockneten Zellen beträgt ca. 4 µm. In 45A-B ist die Aufnahme und das Spektrum der Flächenanalyse eines Bildausschnittes dargestellt.

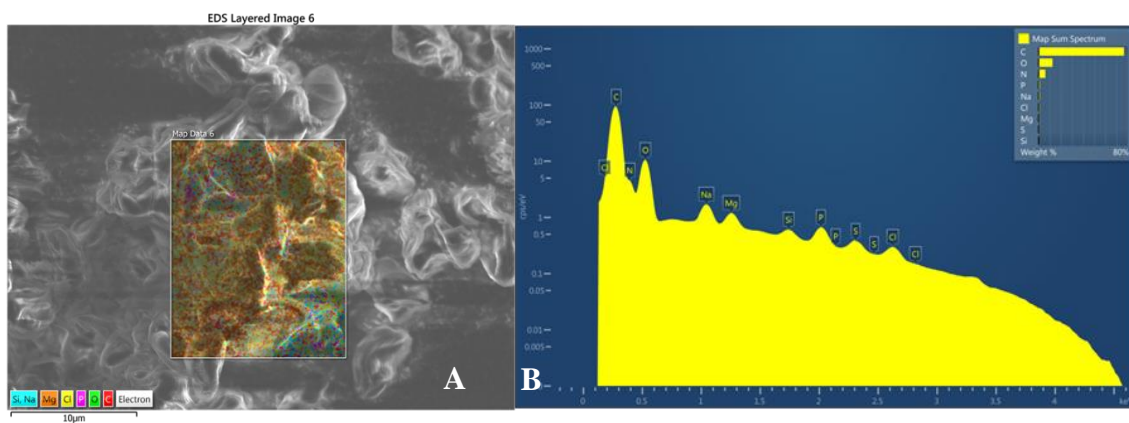
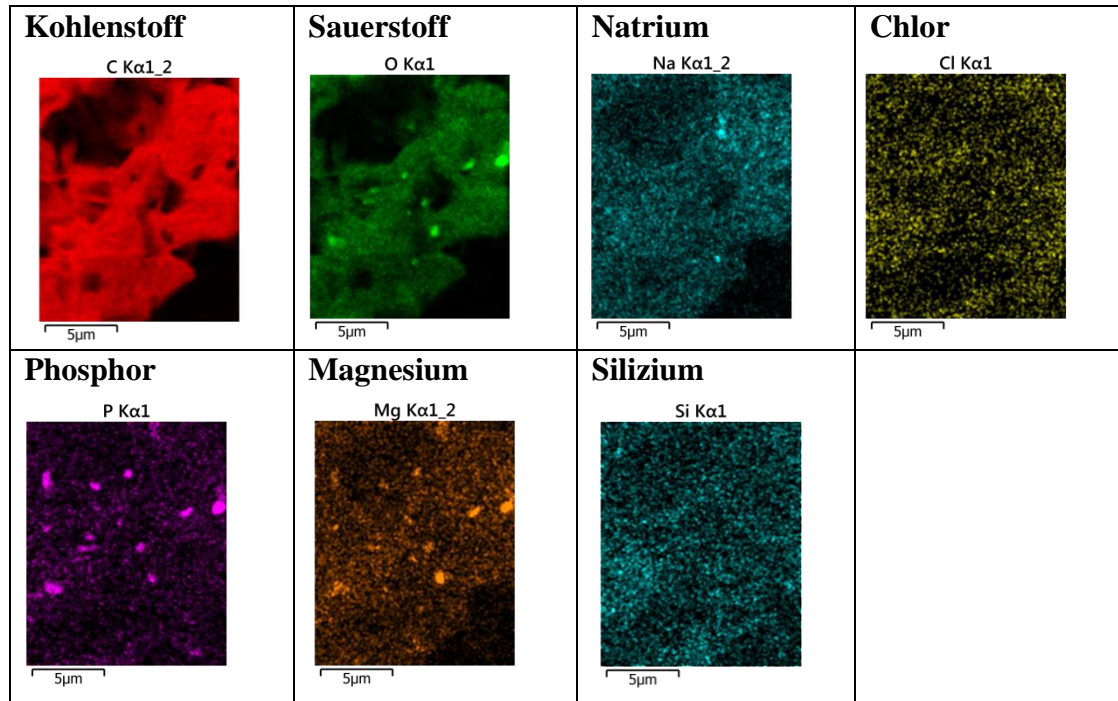


Abb. 45A-B: Ausgewählte Fläche für die Elementanalyse aus einer Probe von *S. obliquus* (S.o.1) (A); Spektrum der Elementanalyse für diesen Bildausschnitt (B)

In Abb. 46 befinden sich die entsprechenden Flächenanalysen einzelner Elemente für den Bildausschnitt aus Abb. 45A.

Abb. 46: Flächenanalyse einzelner Elemente (EDX-Analyse) von *S. obliquus* für den Bildausschnitt von Abb. 45A mit einem Maßstab von 5 µm



Wie aus den Flächenanalysen von Abb. 46 hervorgeht, ist anhand der Kohlenstoff- und Sauerstoffanteile eine inhomogene Höhenstruktur durch die Zellen erkennbar. Für die dargestellten Elemente Natrium, Silizium und Chlor ergab sich eine relativ gleichmäßige Verteilung. Die Darstellungen von Sauerstoff, Magnesium und Phosphor zeigen lokal erhöhte Konzentrationen. Wie bei *C. vulgaris*-Proben wiesen die Flächenanalysen für *S. obliquus* eine homogene Verteilung von Natrium und Chlor auf. In Tab. 22 ist die durchschnittliche Elementverteilung für die zwei analysierten *S. obliquus*-Proben zusammengefasst.

Tab. 22: Durchschnittliche Elementverteilung der Proben von *S. obliquus*

Element	Probe	
	S.o.1	S.o.2
Kohlenstoff	75,03	76,75
Sauerstoff	13,38	12,44
Natrium	2,65	1,05
Chlor	4,46	0,87
Stickstoff	2,22	6,08
Phosphor	0,73	1,14
Magnesium	0,42	0,68
Schwefel	0,72	0,65
Kobalt, Kalium	-	-
Silizium	0,38	0,35

Aus der Tab. 22 geht ein hoher Anteil von Kohlenstoff und Sauerstoff für den jeweiligen Bildausschnitt hervor. Natrium und Chlor konnte in geringeren Konzentration als in den Proben von *C. vulgaris* nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den *C. vulgaris*-Proben konnte kein Kobalt bestimmt werden.

4.8.2 Diskussion der REM-Untersuchung

Durch die Untersuchung der Oberflächenstruktur konnte die unterschiedliche Morphologie von *C. vulgaris* und *S. obliquus* mit einer hohen Auflösung dargestellt werden. Sowohl die kugelförmige Geometrie von *C. vulgaris*, als auch die längliche Struktur von *S. obliquus* konnten reproduzierbar gezeigt werden. Hierfür ist die Untersuchungsmethode sehr gut geeignet. Eine Abhängigkeit der Feinstruktur von der Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden. Dies kann auf eine stabile Geometrie der Zellen gegenüber der Behandlung mit verschiedenen Photoperioden bzw. gegenüber der LED-Belichtung und den daran gebundenen Veränderungen im Nährmedium hindeuten. Für die Auswertung der Morphologie muss zudem berücksichtigt werden, dass durch den Eintrocknungseffekt Veränderungen stattfinden.

Eine Auswertung zur Aufklärung der Elementverteilung in Bezug auf versuchsbedingte und spezies-spezifische Unterschiede war nicht exakt möglich. Diese wurde vermutlich auf Grund der Präparation der Algenzellen verfälscht. Dafür wurden die Proben vor der Trocknung nach Versuchsende zweifach mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gewaschen (vgl. Kapitel 3.3.7, S. 38), um Medienbestandteile von den Zellen abzulösen. Auf Grund der insbesondere bei *C. vulgaris*-Proben nachgewiesenen hohen Anteile von Na und Cl, ist davon auszugehen, dass dieser Elemente durch die Salzurückstände nach der Waschung der Zellen verursacht wurden. Dies bekräftigen auch die Aufnahmen der Zellen, die einen Belag über den Algenzellen aufweisen (z. B. Abb. 40A). Auf Grund der geringeren Anteile von Na und Cl in den Proben von *S. obliquus*-Zellen deutet es sich an, dass diese Zellen vermutlich weniger NaCl der Waschlösung gebunden hatten. Dies kann durch die besseren Absetzeigenschaften der Zellen beeinflusst worden sein, da *S. obliquus*-Zellen nach den Zentrifugationsschritten, zur Waschung der Proben, festere Pellets aufwiesen. Dadurch konnte die NaCl-Lösung effizienter abgenommen werden und geringere Anteile von NaCl auf den Proben verbleiben. Weiterhin können auch Rückstände des Nährmediums mit den Hauptelementen Kalium, Stickstoff, Phosphor, Schwefel und Magnesium die Auswertung der Einzelelemente verfälschen. In den Aufnahmen von *S. obliquus* deuten sich lokale Konzentrationen von Phosphor, Magnesium und Sauerstoff an, die auf die Verteilung im Zellkern oder den Chloroplasten verursacht werden kann. Weiterhin auffällig war, dass in 3 von 4 *C. vulgaris*-Proben Kobalt nachgewiesen wurde. Kobalt ist als Mikronährstoff im Nährmedium enthalten und wird z. B. für den Aufbau von Vitamin B₁₂ benötigt wird. Die Ergebnisse deuten daher auf eine Akkumulation von Kobalt in den Zellen hin.

Für eine weitere Anwendung dieser Methode muss die Probenaufbereitung optimiert werden, so dass keine Rückstände des Mediums oder von Waschlösungen vorliegen. Eine Aufbereitung ohne NaCl erwies sich jedoch im Rahmen dieser Versuche als nicht geeignet, da dadurch keine festen Pellets nach dem Zentrifugieren erreicht wurden und Medienbestandteile nicht abgenommen werden konnten.

5 Zusammenfassende Diskussion

5.1 Arbeitsziel

Im Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf zwei ausgewählte Mikroalgenarten, *C. vulgaris* und *S. obliquus*, aus der Abteilung der Chlorophyta untersucht, um Optimierungen zur Steigerung der Biomasse- oder Stoffwechselaktivität herauszuarbeiten. Untersucht wurden dabei die Parameter:

- 1 Photoperiode (14:10-h, 20:4-h, 22:2-h,- 24:0-h mit *C. vulgaris* und zusätzlich 16:8-h und 18:6-h mit *S. obliquus*),
- 2 spektrale Lichtzusammensetzung bei der Belichtung mit Leuchtstoffröhren und Leuchtdioden mit *C. vulgaris*,
- 3 zusätzliche UV-A- (bei 370 nm) und UV-B-Strahlung (312 nm) mit *C. vulgaris* und
- 4 zusätzliche Mikrowellen-Bestrahlung bei einer Arbeitsfrequenz von 2,45 GHz mit *C. vulgaris* und *S. obliquus*.

Die Ergebnisse Lichtnutzungseffizienz, der zellulären und volumetrischen Gehalte bzw. Erträge und die Ergebnisse der statistischen Auswertung befinden sich im Anhang 6 (S. 154), 7 (S. 158) und 8 (S. 162). Die Einflüsse der verschiedenen Behandlungsvariationen werden in den folgenden Kapiteln zusammenhängend diskutiert.

5.2 Wachstumsprofile und Biomassebildung

Auswertung der Wachstumsprofile

Wachstumsprofile wurden für alle Behandlungen durch die Ermittlung der Wachstumsraten auf Basis der Zellzahlen erstellt.

Unabhängig von der Behandlung zeigten die Wachstumsprofile von *C. vulgaris* eine kurze Adaptionsphase von 24 h. Die anschließende exponentielle Phase endete nach 72 bis 96 h. Die maximale Wachstumsrate wurde nach 48 bis 72 h erreicht. Je länger die Photoperiode eingestellt war, desto frühzeitiger wurde die maximale Wachstumsrate erreicht. Die Wachstumsprofile von *S. obliquus* zeigten keine Adaptionsphase, da die maximale Wachstumsrate bereits nach 24 h erreicht wurde. Die exponentielle Wachstumsphase war entsprechend nach ca. 48 h beendet. Eine Abhängigkeit von der Photoperiode konnte dabei nicht konkret zugeordnet werden. Die kurze Adaptionsphase von *C. vulgaris* kann durch einen langsameren Verbrauch verfügbarer Nährstoffe bzw. durch die Adaption an photoautotrophe Wachstumsbedingungen deuten, da *C. vulgaris*-Kulturen photoheterotroph vorkultiviert wurden. Nach MacIntyre und Cullen (2005) ist in Batch-Kulturen die Adaptionsphase kurz, wenn es sich um ein hohes Inokulum handelt oder die Zellen sich in einem ähnlichen Medium befinden wie in der Vorkultur und damit schon angepasst sind. Dies wird vor allem durch die *S. obliquus* Kulturen bestätigt, welche keine Adaptionsphase aufwiesen. Da im Vergleich zur Vorkultivierung eine Intensitätserhöhung von $80,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $324,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (*C. vulgaris*) bzw. von $108 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zu $306,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (*S. obliquus*) zur Behandlungskultur erfolgte, kann auch dadurch das Wachstum bzw. die Zellteilung gefördert worden sein.

Nach Becker (1994) kann die Entnahme von Zellen aus der Vorkultur, die sich in der Adaptions-, exponentiellen oder frühen stationären Phase befinden, zu einer kurzen Adaptionszeit führen, da diese Zellen bereits eine hohe Teilungsbereitschaft durch eine hohe physiologische Aktivität aufweisen. Dies führe zu einer höheren Sensitivität der Zellen in Bezug auf Veränderungen ihrer Umgebungsbedingungen. Daher wurde die Behandlung der beiden Kulturen in Bezug auf die UV- und Mikrowellenbestrahlung u. a. in diesem Zeitrahmen durchgeführt bzw. begonnen. In welcher Wachstumsphase sich die Zellen der Vorkulturen befanden, wurde nicht untersucht. Auf Grund der Zugabe von Nährmedium ca. sechs Tage vor Versuchsbeginn ist davon auszugehen, dass die Nährstoffe bereits limitiert vorlagen und sich die Zellen in der (frühen) stationären Phase zum Versuchsbeginn befanden.

Die Adaptionszeit von 24 h bei *C. vulgaris* kann andeuten, dass die Umstellung von photoheterotroph zu photoautotroph keinen langfristigen Prozess für die *C. vulgaris*-Zellen bedeutet und ein Wechsel zwischen diesen Kultivierungsbedingungen schnell möglich ist. Nach Liang et al. (2009) und Bell (2012) können Mikroalgen spezifische autotrophe oder heterotrophe Kulturen sein, wenn diese Kulturbedingungen als Langzeitbedingungen wie z. B. nach Isolation aus spezifischen Abwässern, angeboten wurden. Dabei können die Stoffwechselwege zur Verarbeitung von organischen und anorganischen Verbindungen bei einigen Arten parallel oder nur im Wechsel erfolgen (Perez-Garcia et al. 2011, Bell 2012). Unter natürlichen Bedingungen können Mikroalgen beides: heterotrophes Wachstum in der Nacht und autotrophes Wachstum am Tag (Hammed et al. 2016). Liang et al. (2009) nutzten autotrophe Vorkulturen als Ausgangspunkt für heterotrophe Kultivierungsversuche. Dafür wurden von den autotrophen Kulturen drei weitere Subkulturen gezogen, welche an das künftige Versuchsmedium mit organischen Kohlenstoffquellen adaptiert wurden. Im Anschluss konnten hohe Wachstumsraten als Indiz für eine Anpassung an die neuen Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Anpassung an den Wechsel zwischen autotrophen und heterotrophen Bedingungen mehrerer Generationszeiten bedarf. Dies könnte die geringeren Wachstumsraten und die Adaptionsphase innerhalb der ersten 24 h bei *C. vulgaris* erklären. Martínez und Orús (1991) zeigten in ihren Versuchen, dass *C. vulgaris*-Kulturen, die aus Abwässern der Zuckerindustrie isoliert wurden, höhere Wachstumsraten durch die Zugabe von Glucose aufwiesen als durch zusätzliches CO₂ (2 %) bzw. durch CO₂ aus der Umgebungsluft. Die Autoren vermuten, dass vorkultivierte photoheterotrophe Kulturen Glucose als Kohlenstoffquelle für das Wachstum präferieren, aber auch sowohl organischen als auch anorganischen Kohlenstoff gleichzeitig verwerten können. Da die *C. vulgaris*-Vorkulturen über viele Generationen an Glucose als Kohlenstoffquelle adaptiert waren, kann somit die kurze Adaptionszeit der Wachstumsraten in den Versuchen dieser Arbeit verursacht worden sein. Andererseits zeigt dies aber auch, dass der Stoffwechsel schnell zur Nutzung anorganischer Kohlenstoffquellen von *C. vulgaris* umgeschaltet werden kann. Durch einen Vergleich zu photoautotrophen Vorkulturen von *C. vulgaris* in weiteren Experimenten müsste dies untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob und inwieweit durch den Wechsel der photoheterotrophen Vorkultivierung zur photoautotrophen Versuchskultivierung das Wachstumsprofil verändert wird. Dadurch können Anpassungen an Veränderungen der Kohlenstoffquelle diskutiert werden.

Durch die LED-Belichtung konnten bei *C. vulgaris*-Kulturen im Vergleich zu anderen Belichtungsvarianten hohe Wachstumsraten bis 72 h nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Zudem sank die Wachstumsrate dabei zunächst verzögert und anschließend konstant bis zum Ende, während die Wachstumsraten von *C. vulgaris*-Kulturen, die mit Leuchtstoffröhren belichtet wurden eine schnellere Reduzierung aufwiesen. Bei *S. obliquus*-Kulturen konnte ein erneuter Anstieg der Wachstumsrate nach 72 bis 96 h gezeigt werden. Je länger die Photoperiode dauerte, desto früher erfolgte dieser Anstieg und desto höher war der am Ende erreichte Biomassertrag. Bei *C. vulgaris*-Kulturen konnte dies nicht in dieser Deutlichkeit beobachtet werden. Zwischen 144 und 192 h deutete sich in den Kulturen mit einer Photoperiode von ≥ 20 h ein kurzer Anstieg an, welcher in der 14:10-h Variante nicht nachweisbar war. Auf Grund der Überprüfung des Nitratgehaltes im Medium, deutet sich eine Abhängigkeit dieses zweiten Anstieges von der Nitratverfügung, insbesondere für *S. obliquus*, im Medium an. Die Nitratmessungen ergaben einen vollständigen NO_3^- -Verbrauch in Abhängigkeit von der Länge der Photoperiode, der jedoch für eine Variante um 24 h schwankte. Für *C. vulgaris* bedeutete dies, dass mit Ausnahme der 14:10-h und LED-Variante nach ca. 144–168 h Stickstoff verbraucht war. Für LED belichtete Kulturen konnte bereits nach 120 bis 144 h kein Nitrat im Medium mehr nachgewiesen werden. *S. obliquus*-Kulturen wiesen ebenfalls mit Ausnahme des 14:10-h Variante einen vollständigen Nitratverbrauch nach ca. 120 h (unter Dauerbelichtung) bis 168 h (bei 16:8-h) nach Versuchsbeginn auf. Da die Nährmedien an das 14:10-h Regime angepasst waren, konnte für diese Belichtungsvarianten bis 192 h bei beiden Spezies nach Versuchsbeginn Nitrat nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Zeitpunkte des Nitratverbrauches für eine Belichtungsvariante zeigt zum einen die hohe Variabilität in den Versuchen und zum anderen waren die Ausgangsbedingungen nicht identisch. Durch die Vorkulturen wurden jeweils unterschiedliche Gehalte von NO_3^- in die Hauptkultur übertragen, obwohl diese gleich behandelt und das Medium regelmäßig und gleichmäßig erneuert wurde. So ergaben sich Startkonzentrationen von 334–389 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ in *C. vulgaris*-Startkulturen und 516–548 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ in *S. obliquus*-Startkulturen.

Einfluss Nährstofflimitierung

Unter limitierenden Bedingungen können Mikroalgen ihren Stoffwechsel umstellen, eigene Stoffwechselprodukte abbauen oder ein Produkt sekretieren, welches als weiteres Substrat assimiliert werden kann. Dadurch können Verbindungen für weiteres Zellwachstum und Biomasseproduktion bereitgestellt werden. Dies kann z. B. durch Sekretion von Kohlenstoffverbindungen wie Acetat in der Dunkelphase oder den Abbau von stickstoffreichen Verbindungen wie z. B. Chlorophyll und Proteinen zur Freisetzung von Stickstoff erfolgen. (Li et al. 2008, Bell 2012) Die Ergebnisse legen auf Grund des zweiten Anstieges nahe, dass *S. obliquus*-Zellen in der Lage sind, unter den entwickelten nährstoff- und lichtlimitierenden Bedingungen ihren Stoffwechsels so umzustellen, dass weitere Substrate zur Verfügung gestellt und für physiologische Prozesse wie Zellteilung und dem Aufbau von Biomasse verbraucht werden können. *C. vulgaris*-Zellen scheinen dazu in geringerem Ausmaß ebenfalls möglich, wie der kurze zweite Anstieg andeutete. Dabei konnte eine Abhängigkeit des Zeitpunktes für die kurzen Anstiege nicht unmittelbar zum Zeitpunkt der Nitratlimitierung zugeordnet werden. Weitere Nährstoffe wurden jedoch nicht bestimmt.

Stickstoffeinfluss

Dass Stickstoff einen Einfluss auf Wachstums- und Stoffwechselprozesse bewirkt, konnte bereits durch andere Studien gezeigt werden. Um die Abhängigkeit des Wachstums und auch der Stoffwechselaktivität vom Nitratgehalt abschätzen zu können, wurde ein Vergleichsversuch mit doppelter KNO_3 -Konzentration im Medium im Vergleich zum Standardmedium mit *C. vulgaris* unter Dauerbelichtung durchgeführt (Kapitel 4.7, S. 89). Die Ergebnisse des Nitrat-Versuches zeigen, dass die Wachstumsrate in den Kulturen mit zusätzlich KNO_3 geringer Anstieg, als die Zellen mit dem Standardmedium. Die Wachstumskurven zeigten weiterhin auch kein erneutes Ansteigen der Wachstumsrate am Ende des Versuches im Gegensatz zu Zellen der Kontrolle. Damit wird die Vermutung bestätigt, dass dieser in Verbindung mit der Stickstoffverfügbarkeit steht.

Piorreck et al. (1984) untersuchten den Einfluss verschiedener Stickstoffquellen- und -konzentrationen auf das Wachstum von u. a. *C. vulgaris* und *S. obliquus*. Die Ergebnisse zeigten, dass *C. vulgaris* bei Konzentrationen von ca. $0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ KNO_3 längere exponentielle Wachstumsphasen und höhere Biomasseerträge erreichten, als mit $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ KNO_3 . Dies könnte den inhibierenden Effekt einer zu hohen KNO_3 Konzentration zu Beginn des Nitrat-Versuches erklären, der den geringeren Anstieg der Wachstumsrate bewirkte. Das hohe Stickstoffkonzentrationen wachstumshemmend und damit als Stressor wirken, postulierten auch Feng et al. (2011). Bei *S. obliquus* konnten Piorreck et al. (1984) dagegen zeigen, dass hohe Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht inhibierend wirkten und längere exponentielle Wachstumsphasen ermöglichten als mit geringeren NO_3^- Konzentrationen. Dies bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, da bereits in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass *S. obliquus* Nitrat schneller verbrauchte als *C. vulgaris*, woraufhin das Standardmedium auf $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ angepasst wurde. Daher sollte das Nährmedium für *S. obliquus*-Kulturen im Vergleich zu *C. vulgaris*-Kulturen mehr Stickstoff, z. B. in Form von NO_3^- enthalten.

CO_2 -Einfluss

Auch die Ergebnisse der CO_2 , 0,75 %-Variante deuten an, dass sich die Zellen an diese Bedingungen zunächst adaptieren müssen. Dieser Prozess dauerte ca. 24 h. Durch den höheren CO_2 -Gehalt in der Begasung konnten höhere Zellzahlen und insgesamt höhere Biomasseerträge im Vergleich zu allen Behandlungsvarianten erreicht werden. Ursache kann zum einen die durch den geringeren pH-Wert des Mediums höhere Verfügbarkeit von CO_2 aus dem Medium sein, welches durch passive Diffusion in die Zellen gelangt. Dadurch stand mehr CO_2 u. a. für die Photosynthese und Atmung zur Verfügung. Dadurch können mehr intrazelluläre Verbindungen aufgebaut werden. Dies wurde jedoch auf Grund des zu starken Anstieges der Zellzahl nicht durchgeführt, um kleinstmögliche Einflüsse durch die variierten Photoperioden, unterschiedlichen Lichtquellen sowie zusätzlicher Mikrowellen- und UV-Strahlung identifizieren zu können. Ist eine Begasung mit zusätzlich CO_2 vorgesehen, ist z. B. eine gestufte Begasung mit steigenden CO_2 -Konzentrationen in Abhängigkeit der Zellkonzentration zu untersuchen. Zu viel CO_2 kann jedoch auch zu einer Versauerung des Mediums und damit einer Hemmung der Photosynthese führen (Hu und Gao 2006). Zudem muss das Nährmedium an die veränderte Wachstumskinetik entsprechend angepasst werden.

Auswertung der Biomasseerträge

Die Auswertung der Biomasseerträge ergab, dass mit steigender Tagesdauer und durch die Belichtung mit dem LED-Modul der Biomasseertrag anstieg. Jedoch unterschieden sich die Varianten mit einer Lichtdauer ≥ 20 h nicht signifikant voneinander. Der höchste Ertrag wurde bei kürzester Photoperiode und zusätzlichem CO₂ erreicht. Jedoch wurden die Kulturen mit einer doppelt so hohen Lichtintensität belichtet. Damit ist diese Variante nur begrenzt vergleichbar mit Varianten ohne zusätzlich CO₂ und geringerer Lichtintensität. In Abhängigkeit von den untersuchten Photoperioden konnte bei den mit Umgebungsluft begasten Varianten eine 1,9-fache Zunahme der Biomasse bei *C. vulgaris* und eine 1,6-fache Zunahme bei *S. obliquus* zwischen der kürzesten und der längsten Photoperiode erreicht werden. Durch die LED-Belichtung (20:4-h) konnte ein signifikant höhere Biomasseertrag um 18 % und eine um 12 % höhere Zellkonzentration im Vergleich zur 20:4-h-Variante mit FL erreicht werden. Der höhere Biomasseertrag der LED-Variante konnte sich durch die hohen und langsamer reduzierenden Wachstumsraten ergeben. Der Effekt der LED-Belichtung kann durch die effizientere Nutzung von roten und blauen Photonen für die Photosynthese und schließlich auch für den Stoffwechsel verursacht worden sein. Lee und Palsson (1996) wiesen eine verstärkte und verfrühte Zellteilung in Mikroalgen durch die Bestrahlung mit rotem Licht nach. Weiterhin können Photonen des roten Lichtes Chlorophyllelektronen höher anregen. Dies führt zu einer signifikanten Erhöhung der Wirkungseffizienz der Moleküle. Dadurch kann mehr ATP synthetisiert werden, welche wiederum für die Synthese von Biomolekülen führen kann, die das Wachstum fördern. (Pérez-Pazos und Fernández-Izquierdo 2011) Untersuchungen von Toro (1989) haben gezeigt, dass die Zellteilung nicht nur von der Dauer der Photoperiode abhängt, sondern auch von der Menge und Eigenschaft der Photonen, die auf die Algenzellen bzw. auf die entsprechenden Rezeptoren treffen. Dies bestätigen die Ergebnisse der LED-Variante, da bei gleicher Photoperiode (20:4-h) und vergleichbarer Intensität, jedoch spezifischen Photonen eine höhere Biomasse und Zellzahl bewirkten. Das spektral charakteristische Licht der Leuchtstoffröhren setzt sich dagegen aus verschiedenen Wellenlängen zusammen, sodass auch Photonen mit wenig Effizienz für die Anregung der Stoffwechselaktivität und Biomassebildung emittiert werden. (Wijanarko et al. 2004) Dadurch ist die Nutzung von Leuchtstoffröhren weniger effektiv. Zusätzlich konnte ein 30 % höherer Stromverbrauch im Vergleich zur 20:4-h Kontrolle mit Leuchtstoffröhren nachgewiesen werden. Zudem besitzen sie eine kürzere Standzeit als LED und haben einen höheren Energieverlust durch Wärme.

Die Ergebnisse des Nitratversuches haben gezeigt, dass die Kultivierung unter nicht-stickstofflimitierenden Bedingungen nicht zu höheren Wachstumsraten und Biomasseerträgen führte. Der Biomasseertrag war im Vergleich zur durchgeführten Kontrollvariante um ca. 26 % und die Zellzahl war im Mittel um 16 % geringer. Dies kann darauf deuten, dass Nitrat als Stickstoffquelle unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Form umgesetzt werden konnte und/oder weitere wachstumslimitierende Faktoren wie z. B. Phosphor, der hohe pH-Wert oder die Belichtungsdauer eine Rolle spielten.

Zellgewicht

Nach Behrens (2005) besteht eine Abhängigkeit zwischen dem Zellgewicht, der Zellkonzentration und der Lichtintensität bei Stickstofflimitierung. So kann nach Behrens et al. (1989) *C. vulgaris* unter N-Limitierung bis zu 50 % der Biotrockenmasse Stärke einlagern. Die Einlagerung von kohlenstoffreichen Verbindungen wie Stärke, kann nach den Untersuchungen von de Winter et al. (2017) auch ohne Stickstofflimitierung induziert werden, da diese mit fehlender bzw. geringerer Respiration ohne Nachtphase bei einer Dauerbelichtung nicht verbraucht sind. Während der Nachtphase kommt es sonst durch die Respiration zu einem Biomasseverlust in der Nacht und tageszeitlichen Schwankungen der Biomasse, die auch die Biomassebestimmung beeinflussen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass mit zunehmender Lichtdauer, das Zellgewicht von *C. vulgaris*-Zellen im Vergleich zur Kontrollvariante (14:10-h) um bis zu 39 % (24:0-h) zunahm (Anhang A 9, S. 167). Die stärkste Zunahme trat bei der CO₂-Variante (0,75 %) mit einer Zunahme von ca. 59 % auf. Die LED- und Nitrat-Variante wies ein um ca. 30 % höheres Zellgewicht im Vergleich zur 14:10-h Kontrolle auf. Bei *S. obliquus* nahm das Zellgewicht erst bei deutlich längeren Photoperioden (≥ 20 h) zu. Die Zunahme der Zellgewichte kann auf eine (zunehmende) Einlagerung von Stoffwechselprodukten, wie z. B. Stärke und Glucose deuten. Da die Zunahme der Zellgewichte mit der Photoperiode bzw. dem Nitratverbrauch korreliert, kann dies die Ergebnisse von Behrens et al. (1989) und de Winter (2017) bestätigen. Da die Kohlenhydrate nicht analysiert wurden, können keine weiteren Aussagen zu einer tatsächlichen Einlagerung dieser Verbindungen getroffen werden. Mikroskopische Untersuchungen konnten jedoch eine granuläre Struktur in den Zellen darstellen, welche auch durch eine deutliche Gelbfärbung gekennzeichnet waren. Diese Beobachtung kann durch die Einlagerung von Lipiden (Gelbfärbung) und von Glucose bzw. Stärke in Stärkekörnchen (granuläre Struktur) im Cytoplasma und/oder an Pyrenoiden bewirkt worden sein. Die Zunahme des Zellgewichtes muss jedoch nicht mit der Zellgröße einhergehen, da Zellen außer bei der Nitrat-Variante eine deutliche Verkleinerung der Zellgröße im Vergleich zu Versuchsbeginn aufwiesen.

Lichtnutzungseffizienz

Zur Bewertung der Lichtnutzungseffizienz wurde das Gesamtlichtintegral bestimmt und auf den Biomassertrag und die Zellzahl bezogen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei kürzeren Photoperioden mehr Energie in Biomasse bzw. für die Zellteilung umgewandelt wurde. Für *C. vulgaris* ergaben sich das 20:4-h Tag-Nacht-Regime bezogen auf den erhaltenen Biomassertrag die beste Lichtnutzungseffizienz. Mit zunehmender Lichtdauer wurde nicht mehr Lichtenergie in Biomasse umgewandelt (Anhang A 6, S. 124). Für *S. obliquus*-Kulturen war bezogen auf den Lichtenergieeinsatz das 14:10-h und die 16:8-h Regime gleichermaßen effizient. Dementsprechend ist eine Kultivierung unter längerer Belichtung zur Produktion hoher Biomasse unter diesem Aspekt und unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen dieser Arbeit bei beiden Spezies nicht optimal.

Untersuchungen von de Winter et al. (2013) deuten an, dass zugeführte Lichtenergie während der Zellteilung energetisch nicht sinnvoll ist. Um die photosynthetische Effizienz zu erhöhen sollte eine Synchronisierung der Kulturen erfolgen, bei denen die Zellteilung in der Nacht erfolgt. Nach de Winter et al. (2017) führt dies auch zu einem physiologischen Vorteil der Kulturen.

Mikroskopische Untersuchungen während der Versuche dieser Arbeit zeigten, dass sich die Zellen zum Probenahmezeitpunkt, der immer zur gleichen Uhrzeit in der Tagphase stattfand, sich in unterschiedlichen Phasen, d. h. vor, während und nach der Zellteilung, befanden. Eine Verschiebung des Zellzykluses kann z. B. durch die zunehmende Limitierung von Nährstoffen und Licht stattgefunden haben. Dadurch können sich auch Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Zellzahl ergeben haben. Die Ineffizienz hoher Lichtenergieeinträge zur Produktion hoher Zellzahlen wurde ebenfalls durch die Auswertung des Gesamtlichtintegrals bezogen auf die Zellzahl bewiesen. Wird mehr Energie durch die Lichtquelle bereitgestellt, als für die Zellteilung oder andere Stoffwechselprozesse benötigt wird, kann diese auch in Wärme umgewandelt werden, um lichtinduzierte Schäden zu verhindern (Sforza et al. 2012).

Einfluss der Mikrowellenbestrahlung

Neben der Untersuchung unterschiedlicher Lichteinflussgrößen auf die Biomasseproduktion sollte auch der Einfluss von Mikrowellen untersucht werden. Dafür wurde eine spezifische Anlage auf Basis eines Bypasssystemes entwickelt, aufgebaut und getestet. Anlagenspezifisch wurde eine feste Frequenz von 2,45 GHz ausgewählt, da auf Grund von Voruntersuchungen (Kap. 4.4, S. 81) sich eine verstärkte Dämpfung der Strahlung bei dieser Frequenz darstellte. Daher wurde eine Wechselwirkung zwischen der Mikrowellenstrahlung und den Algenzellen in diesem Bereich erwartet. Auswirkungen auf das Wachstumsprofil und die Biomassebildung konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits im Kapitel 2.2.3 (S. 21) dargestellt wurde, konnten die genauen Zusammenhänge der Wechselwirkung von Mikrowellenstrahlen mit biologischen Organismen bisher nicht geklärt werden. Das Parameterfenster kann sehr eng sein, sodass bei bereits geringen Abweichungen von 100–200 MHz von der Resonanzfrequenz Effekte nicht mehr induziert werden können (Tambiev und Skalny 2012). Zudem handelt es sich bei den Zellen um ein dynamisch veränderndes System, da sich die Eigenfrequenzen, aber auch die Absorptionseigenschaften der Zellen in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zelle wie z. B. der Wassergehalt, die Molekülgröße, das Alter der Zelle und die biochemische Zusammensetzung ändern können. Somit wurden durch die fest eingestellte Frequenz von 2,45 GHz möglicherweise Resonanzfrequenzen nicht getroffen. Es konnten auch keine Veränderungen oder Schädigungen auf der Basis von mikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Auswertung der theoretischen und praktischen Erwärmung ergab eine rasche Abkühlung nach der Behandlung im Kultivierungskolben. Zudem ergaben Messungen mit einer hochauflösenden Infrarotkamera einen nicht zur Leistung proportionalen Temperaturanstieg und somit einen geringeren Übertragungsgrad bei hohen Leistungen der Anlage. Thermische Effekte wurden in den Kulturen mit gepulster Behandlung jedoch nicht angenommen.

Einfluss UV-Strahlung

Bezüglich der untersuchten UV-Strahlung zeigte sich eine Reduktion der Biomasse und der Zellzahl durch die UV-A- und UV-B-Strahlung an. Dies deutet auf eine Inhibierung oder Schädigung des Zellteilungsprozesses und der Photosynthese hin, da diese in photoautotrophen Organismen auch eines der hauptsensitiven physiologischen Ziele durch UV-Strahlung darstellt (Hideg et al. 2013, Vass et al. 2005). Eine Schädigung des Photosyntheseapparates kann zu verminderten Wachstumsraten und bis zum Zelltod führen. Durch die potentielle vermehrte Bildung von ROS und der Ausbildung von oxidativem Stress können z. B. auch die biochemische Aktivität und sensitive Moleküle und Zellbestandteile verändert und geschädigt werden (He und Häder 2002, Vincent und Neale 2000). UV-B Strahlen können dabei die DNA in höherem Maße schädigen als UV-A Strahlen. Dies entspricht den Beobachtungen in den Versuchen dieser Arbeit, da die Biomasse und die Zellzahl in Kulturen, die mit UV-B-Strahlung behandelt wurden, etwas stärker reduziert war im Vergleich zur Versuchskontrolle als durch UV-A-Strahlung. Die mehrstündige UV-A-Bestrahlung am Ende des Versuches 4, welche sowohl während der Tagphase als auch während der Nacht erfolgte, zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Biomasse und Zellzahl. Dies weist darauf hin, dass Algen in der stationären Phase weniger sensibel, auf die UV-A Bestrahlung reagierten als bei einer Behandlung zu Beginn des Versuches in der Adaption- oder exponentiellen Phase. Weiterhin können die in den Zellen ausgelösten Reaktionen auf die Bestrahlung noch im Rahmen der möglichen Anpassungsmechanismen durch z. B. Reparaturmechanismen liegen und somit zu keiner Veränderung des Wachstums- und Zellteilungsverhaltens führen (Häder et al. 2011). Ein Einfluss der Pumpe wurde durch Referenzmessungen ohne UV-Strahlung nicht festgestellt.

5.3 Einfluss auf die Stoffwechselprodukte

Im Folgenden wird die Auswirkung der untersuchten spektralen Bereiche im Zusammenhang mit der nachgewiesenen Stickstofflimitierung diskutiert. Als CO₂-Variante werden die Ergebnisse der Versuche mit einem CO₂-Anteil von 0,75 % in der Begasungsluft beschrieben.

5.3.1 Proteine

Mikroalgenproteine sind von großem Interesse als Quelle von bioaktiven Peptiden auf Grund ihres therapeutischen Potentials zur Behandlung verschiedener Krankheiten. Proteine, Peptide und Aminosäuren können dabei verschiedene Funktionen wie z. B. als Wachstumsfaktoren, Hormone und Immunmodulatoren aufweisen. (Ibanez und Cifuentes 2013) Daher werden Mikroalgen wie *Chlorella* sp. und *Spirulina* sp. als Functional Food verwendet (Jesus Raposo et al. 2013). Durch den potentiell hohen Proteinanteil besitzen sie einen hohen Nährwert und sind auch für die Tierfutterindustrie von Interesse. In den Mikroalgenzellen besitzen sie u. a. Funktionen als Proteinkanäle durch Zellmembranen oder als Proteinkomplexe in Lichtsammelkomplexen.

Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit als Gesamtproteingehalt bestimmt, sodass keine differenzierte Auswertung zur Proteinherkunft- und funktion erfolgte. Die Bestimmung erfolgte über den Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proteinbestimmung in Abhängigkeit der Spezies und der Behandlung kurz zusammengefasst und diskutiert.

Der relative Proteingehalt der *C. vulgaris*-Kulturen war nach Versuchsende in der Nitrat-Variante mit 65 % von der Biotrockenmasse am höchsten und in der CO₂, 0,75 % -Variante am geringsten (10 %). Der absolute zelluläre Gehalt wies zwar keine eindeutige Korrelation zur Photoperiode auf, jedoch ergaben die relativen Gehalte, dass mit Zunahme der Photoperiode der prozentuale Proteingehalt pro Zelle von 32 % bei 14:10 zu 23 % bei Dauerlicht sank. Dies weist auf eine verringerte Proteinbiosynthese bzw. einen Proteinabbau mit Dauer der Photoperiode hin. Dennoch konnte durch die mit der Zunahme der Photoperiode steigende Zellkonzentration der volumetrische Ertrag bei *C. vulgaris* gesteigert werden, sodass mit der Dauerbelichtung der höchste Ertrag erreicht wurde. Bei der LED-Variante war der prozentuale Proteingehalt zwar geringer als in der 20:4-h-Kontrollvariante, jedoch konnten auch dabei ein ähnlicher volumetrischer Ertrag durch die höheren Zellzahlen am Ende erreicht werden. Die LED-Variante hat gezeigt, dass durch eine geeignete spektrale Zusammensetzung zwar auch der Proteingehalt verringert wird, jedoch durch den geringeren Stromverbrauch ein wesentlicher Kostenfaktor bei künstlicher Belichtung reduziert werden kann und die hohen Zellkonzentrationen einen vergleichbaren Proteingewinn im Vergleich zur Verwendung von Leuchtstoffröhren bei kürzeren Photoperioden ermöglichen.

In *S. obliquus*-Zellen zeigte sich im Vergleich zu *C. vulgaris*-Zellen ein höherer absoluter Proteingehalt in Abhängigkeit von der Photoperiode. Wie bei *C. vulgaris* sank der relative Anteil in den Zellen von 32 % bei 14:10-h auf ca. 20 % in der Dauerlichtvariante. Eine Korrelation des absoluten Proteinanteils pro Zelle zur Photoperiode konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch deutet sich eine Reduzierung mit Zunahme der Photoperiode an. Bezogen auf den volumetrischen Ertrag ergab sich ein ausgeglichenes Verhältnis, sodass mit jeder Variante etwa gleich viel Protein gewonnen werden konnte (Anhang A 7, S. 158).

Stickstoffeinfluss

Wie bereits im Kapitel 5.2 (S. 98) beschrieben wurde, konnte durch die reflektometrische Messung der zellzahlabhängige Stickstoffverbrauch nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass eine N-Limitierung bzw. -verknappung im Medium am Ende der Versuche vorlag. Mikroalgen sind jedoch in der Lage ihren Stoffwechsel bei Stickstoffknappheit umzustellen, und den aufgenommenen Kohlenstoff zum Aufbau von energiereichen Speicher- und Reservestoffen und weniger zur Proteinbiosynthese zu nutzen. Dieser Mechanismus stellt einen bedeutenden physiologischen Vorteil unter limitierenden Bedingungen dar. (Rigano et al. 1998, Hu 2007, Mandal and Mallik 2009, Siaut et al. 2011, Adarme-Vega et al. 2012, Belotti et al. 2013)

Ein wesentlicher Bestandteil von Proteinen ist Stickstoff. Eine verminderte Proteinbiosynthese in Folge einer Stickstofflimitierung kann die photochemische Energieumwandlung beeinflussen. Nach Kolber et al. (1988) ist jedoch nicht die Synthese aller Proteine gleichermaßen betroffen. So verringerte sich nach Kolber et al. (1988) der Anteil der Chloroplastenproteine wie CP47, CP43 und dem D1-Protein unter Stickstofflimitierung.

CP47 und CP43 sind Transmembranproteine in der Thylakoidmembran, welche Chlorophyll im PS II binden und D1 ist ein Protein im Reaktionszentrum des PS II. Nach Kolber et al. (1988) kann die Synthese von cytoplasmatischen Proteinen mit der Synthese von Chloroplastenproteinen um Aminosäuren konkurrieren. Durch eine reduzierte photochemische Umwandlungseffizienz kann die Photosyntheserate und dadurch u. a. auch der Aufbau von Biomasse oder Zellteilungsprozesse reduziert sein. Andererseits können stickstoffreiche Verbindungen wie z. B. Chlorophyll als intrazellulärer Stickstoffpool verwendet werden, um freiwerdenden Stickstoff z. B. zur Synthese von Enzymen und zum Aufbau weiterer essentieller Zellbestandteile zu verwenden, wodurch z. B. weiteres Zellwachstum und Biomasseproduktion ermöglicht werden kann (Li et al. 2008). Eine Stickstofflimitierung im Medium kann folglich mehrere Prozesse in den Zellen induzieren, die zu einem verminderten absoluten Proteingehalt und Erhöhung anderer Stoffwechselprodukte führen können. Da jedoch nur der Gesamtproteingehalt bestimmt wurde, können keine Aussagen zur Zunahme oder Abnahme spezifischer Proteine, z. B. in der Funktion als Enzyme oder Transporter in bestimmten Membranen. Auf Grund der zwar nicht signifikanten, aber einer tendenziellen Abhängigkeit des Chl a-Gehaltes vom Proteingehalt in den Zellen beider untersuchter Mikroalgenarten, ist auf eine Beeinflussung durch die Photoperiode bzw. durch die daraus resultierenden Bedingungen (erhöhte Zellteilung und beginnende Stickstofflimitierung) auf den Gehalt Chl a-Proteinkomplexe in den Photosystemen zu schließen.

UV- und Mikrowelleneinfluss

Die Ergebnisse der UV-Versuche zeigten einen höheren Proteingehalt in Kulturen mit geringerer Biomasse und Zellzahl. Untersuchungen des Stickstoffverbrauches erfolgten nicht. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Zusammenhang zwischen den Faktoren Proteingehalt und N-Verfügbarkeit bestand, sodass Zellen in Kulturen mit geringerer Zellteilungsaktivität einen höheren Proteingehalt auf Grund der längeren N-Verfügbarkeit aufweisen. Dies bestätigen die Ergebnisse des Nitrat-Versuches. Für die Mikrowellenbehandlung konnte kein veränderter Proteingehalt nachgewiesen werden.

Lichtnutzungseffizienz

Die Auswertung des TLI für den volumetrischen und auch den zellulären Gehalt ergab, dass sich bezogen auf die Lichtvarianten die kürzeste Tagvariante bei beiden Spezies am effektivsten zur Proteinproduktion darstellte. Der Einsatz der LED wies eine verbesserte Lichtnutzungseffizienz im Vergleich zur 20:4-h Kontrolle auf. Bei *S. obliquus* reduzierte sich die Effektivität mit der Photoperiode deutlich.

Die erreichten Proteingehalte in den Standardmediumversuchen waren unter den Werten, die in der Literatur mit ca. 51–58 % (Tab. 2, S. 6) angegeben werden. Um höhere Proteingehalte in den Zellen zu erhalten, müssen höhere Stickstoffgehalte im Medium über die gesamte Kultivierungszeit und entsprechend des Zellwachstums, z. B. durch eine gestufte Zuführung, bereitgestellt werden. Eine zu hohe Stickstoffkonzentration kann jedoch auch limitierend wirken. Zudem muss dies unter Berücksichtigung des Produktionszieles erfolgen. Eine gezielte Stickstofflimitierung nach einer hohen Zellteilungsaktivität kann ebenfalls eine Strategie z. B. zur Synthese von Lipiden darstellen.

5.3.2 Chlorophyllgehalt

Während der Versuche wurde der Chlorophyll a-, b- und der Gesamtchlorophyllgehalt aus methanolischen Extrakten sowie aus gefriergetrockneten Proben vom Versuchsende mittels HPLC ermittelt. Da Chlorophyll a in allen Mikroalgen vorkommt und u. a. eine wesentliche Bedeutung im Lichtsammelkomplex und somit zur Energieumsetzung besitzt, erfolgt in der Diskussion ein Fokus auf die Chl a-Konzentration.

Abhängigkeit von der Photoperiode

Bezogen auf Untersuchung des Einflusses der Photoperiode und Lichtquelle zeigten die Ergebnisse der methanolischen Extrakte bei *C. vulgaris* einen steigenden zellulären Chl a-Gehalt mit einem Maximum nach 24 h (bei 24:0-h und LED) oder 48 h (bei 22:2-h, 20:4-h, 14:10-h und LED). Der maximale Zellgehalt an Chl a unterschied sich zwischen den untersuchten Varianten mit unterschiedlicher Photoperiode im Mittel um maximal 7 % (Anhang A 10, S. 167). Dies deutet an, dass unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr Chl a gebildet werden konnte bzw. die Chl a-Synthese möglicherweise auch von der verfügbaren N-Menge abhängig war. Die stickstoffabhängige Chlorophyllkonzentration wurde durch den Nitratversuch bestätigt. Die Zellen dieser Variante wiesen eine höhere Chl a-Konzentration im Vergleich zu Zellen der Kontrolle auf. Bei den Zellen der LED-Variante stieg dagegen der Chl a-Gehalt nur geringfügig zum Startwert an und erreichte ein Maximum zwischen 24–48 h. Die maximale Chl a-Konzentration war ca. 40 % geringer im Vergleich zu den Varianten mit unterschiedlicher Photoperiode. Den Anstieg der Chlorophyllkonzentration in den ersten 24–48 h bzw. den zweiten Anstieg in der Nitrat-Variante können verschiedene Faktoren verursacht haben.

Nach MacIntyre und Cullen (2005) kann durch den Anstieg von Chl a in den Zellen eine beginnende Selbstbeschattung und somit eine zusätzliche Lichtlimitation und zunehmende Konkurrenz um das Licht andeuten. Dadurch haben Algen mit einem höheren Chl a-Gehalt einen physiologischen Vorteil, da mehr Photonen und damit mehr Energie aufgenommen werden kann. Diese Energie kann für die Photosynthese und den Stoffaufbau genutzt werden. Durch die Intensitätserhöhung der Belichtung von der Vorkultur zur Behandlungskultur kann die Chl a-Synthese ebenfalls induziert worden sein. Durch die höhere Chl a-Konzentration am Anfang der Versuche konnte auch eine effizientere Ausnutzung der Lichtenergie erfolgen, wodurch Photosyntheseprozesse verstärkt und höhere Zellteilungs-raten erreicht wurden. Zudem waren zu Beginn der Versuche andere Nährstoffe noch nicht limitiert. Dies bestätigt auch der Beobachtung, dass die maximale Wachstumsrate ca. 24 bis 48 h nach der maximale Chl a-Konzentration erreicht wurde. Es ist daher von einem zeitlichen Zusammenhang der Wachstumsrate und der höchsten Chlorophyllkonzentration auszugehen.

Der Verlauf der Chlorophyllkonzentration in Abhängigkeit von der Photoperiode war bei *S. obliquus* zum Teil gegensätzlich zu den Beobachtungen bei *C. vulgaris*. So wurde nach 24 h um bis zu 40 % weniger Chl a-Gehalt in den Zellen bestimmt. Anschließend zeigten Messungen einen Anstieg des Chl a-Gehaltes nach 24 h bis zu einem Chl a-Maximum nach 72 bis 96 h. Bis zum Ende der Versuche sanken die Chl a-Konzentrationen wie bei den *C. vulgaris*-Zellen.

Der reduzierte Chl a-Gehalt nach 24 h in *S. obliquus*-Zellen kann durch die starke Zellteilung innerhalb der ersten 24 h verursacht worden sein, da in diesem Zeitraum auch die maximale Wachstumsrate erreicht wurde. Dadurch kann die zelluläre Produktion von Chlorophyll zeitlich so versetzt stattgefunden haben, dass zum Probenahmezeitpunkt geringere Konzentrationen ermittelt wurden. Im Gegensatz zu *C. vulgaris* waren die *S. obliquus*-Vorkulturen bereits an die photoautotrophe Kultivierung adaptiert, sodass keine Umstellung der C-Verwertung erfolgen musste. Wie aus den Wachstumskurven von *S. obliquus* ersichtlich wurde, verringerte sich die Wachstumsrate nach dem Erreichen des Maximums nach 24 h stark. Durch die damit verlängerte Verdopplungszeit konnte die Chl a-Synthese in den Zellen erfolgen und somit stieg der Chl a-Gehalt nach 24 bis 96 h zunächst wieder an. Der Anstieg der Chl a-Konzentration kann auch durch die Adaption an eine Lichtlimitation verursacht worden sein.

Nach dem Erreichen der maximalen Chlorophyllkonzentration zwischen 24 h bis 72 h nach Versuchsbeginn konnte in allen *S. obliquus*-Kulturen ein zweiter Anstieg der Wachstumsrate zwischen ca. 72 und 144 h beobachtet werden. Dies entsprach etwa dem Zeitpunkt des beginnenden Chlorophyllabbaus. Somit könnte das erneute Ansteigen der Wachstumsrate durch eine erneute Verfügbarkeit von Stickstoff durch den Abbau von Chlorophyllmolekülen (und Proteinen) in *S. obliquus* verursacht worden sein.

Nährstofflimitierung

Hohe Chl a-Gehalte bedeuteten keine längeren exponentiellen Wachstumsphasen und höherer Biomasseerträge, wie die Nitrat-Variante zeigte. Da eine höhere Verfügbarkeit von Stickstoff zwar zu einem höheren Gehalt an Chl a (und Proteinen) führte, jedoch nicht zu längeren exponentiellen Wachstumsphasen, ist davon auszugehen, dass andere Wachstumsfaktoren wie Licht, Kohlenstoff und Phosphor limitiert waren und somit keine Steigerung der Photosynthese- und Zellteilungsaktivität durch noch verfügbaren Stickstoff möglich war. Es konnte eine negative, für *S. obliquus* auch signifikante, Korrelation des zellulären Chl a-Gehaltes zur Dauer der Photoperiode nachgewiesen werden. Die kann im Zusammenhang mit der zeit- bzw. zellzahlabhängige Stickstoffverfügung stehen. Andererseits sank der Chlorophyllgehalt in den Zellen frühzeitiger, als Nitrat verbraucht war. Mandalam and Palsson (1998) konnten diesen Effekt ebenfalls in Ihren Untersuchungen mit *S. obliquus* demonstrieren. Dies könnte nach den Autoren durch einen N-Schwellwert induziert worden sein. Wie bereits im Kapitel 5.3.1 (S. 105) erwähnt wurde, sind Mikroalgen in der Lage unter Stickstoffmangel durch den Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen wie Chlorophyll und Proteine, Stickstoff für weitere Stoffwechselprozesse zur Verfügung zu stellen. Die Reduktion des Chl a-Gehaltes kann auch mit dem Abbau von Lichtsammelkomplexproteinen (LHCPs) im Zusammenhang stehen, wodurch weniger Energie absorbiert werden kann (Kolber et al. 1988). Fällt der verfügbare Stickstoff unter einen Grenzwert, kann sich die Photosyntheseleistung reduzieren. Dies kann sich auf den weiteren Stoffaufbau auswirken.

Abhängigkeit der spektralen Zusammensetzung

Die geringsten, absoluten Chl a-Zellgehalte enthielten die Zellen, die während der Versuche mit der LED belichtet wurden. Dies deutet auf eine Anpassung des Chlorophyllgehaltes an die spektrale Zusammensetzung der LED hin. Ankommende Photonen von rotem und blauem Licht können auf Grund der Absorption im LHC effizienter genutzt werden. Dadurch werden weniger Chlorophyllmoleküle benötigt, da die Absorption von Chlorophyll (und Carotinoiden) in diesem Bereich des Spektrums am höchsten ist. (Mohsenpour et al. 2012, Schulze et al. 2014) Die Synthese von Chl a scheint dabei mehr beeinflusst zu werden, als von Chl b. Dies wird vermutlich ebenfalls auf Grund der effizienteren Absorption von Chl a verursacht werden. Die hohen Wachstumsraten bei der LED-Variante bei geringerer Chlorophyllkonzentration bestätigen die optimierte Lichtausnutzung. Somit kann ein an die Absorptionscharakteristik der (photosynthetisch aktiven) Pigmente angepasstes Lichtspektrum die Kultivierung der Algen optimiert werden. Die geringere Effizienz der Leuchtstoffröhren ist auf die spektrale Zusammensetzung des emittierten weißen Lichtes zurückzuführen. Dabei treffen Photonen mit weniger Effizienz für die Anregung der Stoffwechselaktivität und Biomassebildung auf die Chlorophyllmoleküle und bewirken in der Folge geringere Erträge bzw. höhere Kosten durch einen höheren Energieeinsatz im Vergleich zur Verwendung von LED (Wijanarko et al. 2004). Die Ergebnisse der UV-A-Bestrahlung deuten eine Reduktion der Chlorophyllkonzentration an, während die Zellen nach der UV-B-Bestrahlung eine erhöhte Konzentration aufwiesen. Durch die geringe Stichprobenzahl und die versuchsspezifischen Variationen ist jedoch eine differenzierte Diskussion nicht möglich und erfordert weitere Untersuchungen. Da UV-A- bzw. UV-B-Strahlung nicht im Absorptionsspektrum von photosynthetisch aktiven Pigmenten liegt, ist keine Erhöhung dieser Verbindungen auf Grund einer besseren Lichtnutzung zu erwarten.

Auswertung des Verhältnis Chl a zu Chl b

Bei *C. vulgaris* scheint durch die Zunahme der Photoperiode bzw. den resultierenden Veränderungen im Medium das Verhältnis von Chl a zu Chl b zu sinken. So wurde in den Zellen mit der kürzesten Photoperiode ein Verhältnis von 2,9 und in der Dauerlichtbehandlung von 2,6 ermittelt. Dies kann durch den stärkeren Einfluss auf die Chl a, als auf die Chl b-Synthese verursacht worden sein. Das hohe Verhältnis von ca. 3 in den Zellen der LED-Variante zeigt auf einen stärkeren Effekt der spektralen Zusammensetzung auf die Chl a- als auf die Chl b-Synthese hin (Kontrolle 20:4-h: Chl a/Chl b = 2,7). Für *S. obliquus* konnte dagegen keine Abhängigkeit von der Photoperiode nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen ähnlich wirkenden Effekt der Belichtungsdauer bzw. der verändernden Umgebungsbedingungen auf die Chl a- und Chl b-Synthese.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Auswirkung auf die Chlorophyllkonzentration sowohl von der Photoperiode, der Nährstoffverfügung am Beispiel von Stickstoff und der spektralen Zusammensetzung der Belichtungsquelle abhing. Primär ist die Pigmentbildung der Mikroalgen nach MacIntyre und Cullen (2005) vom Genotyp abhängig. So ist in allen Mikroalgen Chl a enthalten, jedoch ist die Verteilung von akzessorischen Pigmenten wie Chl b und spezifischen Carotinoiden taxonomisch bestimmt. Durch die Reaktion auf verändernde Umweltbedingungen wird die Pigmentzusammensetzung der Mikroalgen weiter variiert, wie die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. (Berner et al. 1989)

5.3.3 Carotinoide

Carotinoide sind fettlösliche, farbliche Verbindungen und können in primäre und sekundäre Carotinoide unterteilt werden. Die Hauptcarotinoide in Mikroalgen sind β -Carotin, Lycopin, Astaxanthin, Zeaxanthin, Violaxanthin und Lutein (D'Alessandro und Filho 2016).

Im Stoffwechsel der Mikroalgen besitzen Carotinoide zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen dienen sie als akzessorische Pigmente in Form von Pigment-Proteinkomplexen im Lichtsammelkomplex in der Thylakoidmembran und zum anderen schützen sie als photoprotektive Verbindungen vor Schädigungen z. B. bei hohen Lichtintensitäten, UV-Strahlung und vor oxidativem Stress (Cazzonelli 2011). Als Carotinoide wurden im Rahmen der Arbeit β -Carotin, Lutein und Astaxanthin untersucht. Nach Del Campo et al. (2007) gehören diese zu den wirtschaftlich interessantesten Carotinoiden. β -Carotin und Astaxanthin sind interessante Verbindungen in der Lebensmittel und Pharmaindustrie, aber auch in der Futtermittelindustrie auf Grund ihrer Pigmenteigenschaften (de Morais et al. 2015). Sie können z. B. zur Behandlung von degenerativen und kognitiven Krankheiten oder Krebs eingesetzt werden. Dieser Effekt wird vor allem auf die antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt (Guedes et al. 2011, Han et al 2013, de Morais et al. 2015). Astaxanthin ist in der Lage freie Radikale zu binden und hat eine höhere antioxidative Kapazität als andere Carotinoide (D'Alessandro und Filho 2016).

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die bestimmten Carotinoide diskutiert.

Astaxanthin

Astaxanthin gehört zu den sekundären Carotinoiden und wird unter Stress bzw. nachteiligen Kultivierungsbedingungen aus β -Carotin durch β -Carotinoxygenase und β -Carotinhydroxylase in den Zellen umgewandelt (Johnson und An 1991, Johnson und Schroeder 1996). Weiterhin kann Astaxanthin in Lipidkörpern außerhalb der Chloroplasten gelagert werden und als Schutzsubstanzen bei schädlicher Strahlung dienen (Frank und Cogdell 1996). Die Ergebnisse für alle Versuche und für beide Spezies zeigten, dass Astaxanthin nur in geringen Mengen nachweisbar war. Für *C. vulgaris*-Zellen bedeutet dies einen Anteil von 0,02–0,03 % und für *S. obliquus*-Zellen 0,01–0,02 % an der BTM. Für *C. vulgaris* deutete sich eine Verringerung der Astaxanthinkonzentration mit längerer Photoperiode im Medium an. Höhere Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte im Medium führten nicht zu einer Erhöhung des Astaxanthingehaltes in den Zellen. Durch die höheren Biomasserträge bzw. höheren Zellzahlen in diesen Varianten konnten zwar höhere volumetrische Erträge erzielt werden, jedoch war dies unter Berücksichtigung des Energie-

einsatzes für die Lichtquelle nicht effizient. Für *S. obliquus* konnte keine Korrelation zur Photoperiode und damit Abhängigkeit des Astaxanthingehaltes von der Belichtungsdauer nachgewiesen werden. In Mikroalgen wie *H. pluvialis* wurde durch Stickstoffknappheit eine erhöhte Synthese dieses Carotinoids induziert (Fábregas et al. 1998). Diese Reaktion konnte in dieser Arbeit nicht für die untersuchten Mikroalgenarten nachgewiesen werden, obwohl eine Stickstoffknappheit in beiden Spezies durch die zunehmende Zellzahl mit zunehmender Photoperiode bzw. durch die LED-Belichtung erfolgte. Die Stickstoffverfügbarkeit scheint bei *C. vulgaris* und *S. obliquus* somit kein Stimulator für die Astaxanthinsynthese darzustellen. Auch durch die UV-Strahlung konnte kein gesicherter Effekt auf die Astaxanthinsynthese nachgewiesen werden, welches auch an der geringen Datenlage lag. Die Einzelmessungen deuten an, dass durch die UV-B-Behandlung und die lange UV-A Behandlung vor Versuchende die absolute Konzentration von Astaxanthin erhöht wurde. Dies könnte auf eine unspezifische oder spezifische Reaktion auf die Bestrahlung z. B. durch die Bildung von ROS und damit von Stress in den Zellen deuten. Die Ergebnisse der LED-Belichtung zeigten eine im Mittel um 26 % höhere Astaxanthinkonzentration in den Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf. Dies kann auf eine durch die spektrale Zusammensetzung der LED induzierte Umwandlung aus β -Carotin hinweisen. Die untersuchten Kulturen von *C. vulgaris* und *S. obliquus* sind jedoch vermutlich keine geeigneten Kandidaten zur Produktion dieses Carotinoids und auf Grund ihrer genotypischen Veranlagung nicht in der Lage höhere Mengen zu produzieren.

β -Carotin

β -Carotin kommt vor allem im Reaktionszentrum und dem Lichtsammelkomplex vom PS I und im Reaktionszentrum und dem Kern vom LHC von PS II vor (Takaichi 2011). Der β -Carotinanteil in den Zellen betrug in *C. vulgaris*-Zellen 0,02–0,15 % und in *S. obliquus*-Zellen 0,04–0,07 % von der BTM. Dabei deutet sich für beide Spezies eine Abnahme mit der Zunahme der Photoperiode an. Der Vergleich der Ergebnisse der LED belichteten Kulturen zeigte, dass der absolute β -Carotinanteil in den Zellen der LED-Variante im Vergleich zu 20:4-h Vergleichsvariante geringer war. Dies kann auf Grund der spektralen Zusammensetzung reduzierten β -Carotinbiosynthese bzw. verstärkten Umwandlung in Astaxanthin verursacht worden sein. Die Abhängigkeit der Konzentration dieser Verbindungen voneinander deutete sich aus der signifikant positiven Korrelation in beiden Spezies an. Die Nitrat-Variante hat gezeigt, dass der absolute β -Carotinkonzentration fast 180 % höher lag im Vergleich zur Kontrolle (24:0-h, mit Leuchtstoffröhren). Dies weist auf eine stickstoffabhängig β -Carotinsynthese hin. Da β -Carotin und Chl a die Hauptkomponenten in den photochemisch aktiven Reaktionszentren der Photosysteme darstellen, ist die (nicht signifikant) abhängige Abnahme dieser beiden Pigmente mit Zunahme der Photoperiode in beiden Spezies zu erklären. Da durch die Abnahme dieser Verbindungen weniger Energie in den Zellen umgewandelt werden kann, reduziert sich die Photosyntheseeffizienz, und es kommt zu Veränderungen des Stoffwechsels. Für eine Aussage zur Auswirkung der UV-Strahlung können keine Aussagen getroffen werden. Die geringe Anzahl der Daten lässt keine Tendenz diskutieren.

Lutein

Lutein gehört zu den wichtigen Pigmenten, die in den lichtsammelnden Pigment-Protein-Komplexen der beiden Photosysteme gebunden sind (Jahns und Holzwarth 2012). Durch das Absorptionsmaximum bei ca. 445 nm kann Licht in dem spektralen Bereich absorbiert werden, der von den Chlorophyllen nicht maximal absorbiert wird. Damit kann das spektrale Wirkungsspektrum der Photosynthese erhöht werden. Lutein kam in beiden Spezies mit einem Anteil von 0,13–0,44 % an der BTM von *C. vulgaris* und 0,25–0,32 % an der BTM von *S. obliquus* vor und war damit das Carotinoid mit der höchsten Konzentration. Auf Grund der Ergebnisse des Nitratversuches und der Versuche mit zusätzlich CO₂, ist davon auszugehen, dass die Synthese von Lutein stickstoffabhängig war. Die zelluläre Luteinkonzentration war in den LED-belichteten *C. vulgaris*-Zellen höher als in der 20:4-h Vergleichskontrolle, obwohl die LED-Kulturen höhere Biomasse- und Zellerträge aufwiesen und somit stärker in den Nährstoffen und Licht limitiert gewesen sein müssen. Dies deutet an, dass durch die spezifische Zusammensetzung des roten, blauen und grünen Anteils die Luteinsynthese aktiviert wurde. Dies bestätigt auch die Zunahme des Verhältnisses von Lutein zu Chl a in der LED-Variante und deutet auf eine Photoakklimatisierung der Lichtsammelkomplexe an das Lichtspektrum an.

Für Lutein konnte eine positive, nicht signifikante, Korrelation zur β -Carotinkonzentration, insbesondere für *C. vulgaris*, gezeigt werden. Zwar werden diese Carotinoide auf verschiedenen Synthesewegen gebildet, jedoch ist daher von einer abhängigen bzw. gekoppelten Synthese auszugehen. Zum anderen werden die Synthesewege wahrscheinlich gleichermaßen durch die veränderten Umgebungsbedingungen beeinflusst. Diese Abhängigkeit kann durch ihre gemeinsame Bedeutung im LHC erklärt werden.

Verhältnis Chlorophyll a zu Carotinoide

Die Ergebnisse der methanolischen Extraktion, insbesondere bei *S. obliquus*, deuteten eine Reduzierung des Chl a/Car-Verhältnisses mit der Zunahme der Lichtdauer an. Durch die Auswertung des Carotinoidgehaltes aus gefriergetrockneten Proben konnte keine tendenzielle Zunahme des Carotinoidgehaltes mit der Photoperiode nachgewiesen werden. Jedoch wurden nur drei Carotinoide erfasst. Die Veränderung des Verhältnisses kann durch eine stärkere Reduktion des Chl a-Gehaltes als Zunahme der Carotinoide verursacht werden. Die Veränderung des Verhältnisses kann z. B. als Stressindikator dienen, da sekundäre und damit nicht photosynthetisch aktive Carotinoide eingelagert werden können, um z. B. entstehenden oxidativen Stress zu reduzieren oder die überschüssige Energie in Wärme umzuwandeln. Ein geringeres Verhältnis kann daher auf ein höheres Stresslevel in den Zellen hindeuten.

Lichtnutzungseffizienz

Hinsichtlich der Auswertung der TLI-Daten ergab sich, bezogen auf den volumetrischen Ertrag der Carotinoide, die höchste Effizienz für β -Carotin in der 14:10-h Variante. Durch den Nitratzusatz in der Nitrat-Variante stieg die Effizienz an. Jedoch kann dies auch durch die höhere Stickstoffverfügbarkeit und/oder in Kombination mit der Lichtdauer verursacht werden. Für Lutein ergab sich die höchste Lichtnutzungseffizienz durch die LED-Bestrahlung, während für Astaxanthin die 14:10-h-Variante und gleichermaßen durch die LED-Bestrahlung in *C. vulgaris* eine hohe Lichtnutzung ergab. Da für β -Carotin bei der Dauerlichtvariante mit dem Standardmedium die Lichtnutzung deutlich geringer war als durch den Nitratzusatz, ist zu prüfen, wie sich höhere Nitratgehalte auch bei geringerer Photoperiode auswirken, um somit die Gesamteffizienz der Prozesse zu erhöhen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die LED-Belichtung zu prüfen, da z. B. für Lutein die höchste Effizienz mit dieser Belichtungstechnik erreicht wurde. Für *S. obliquus* konnte bezogen auf den volumetrischen Ertrag die höchste Lichtnutzungseffizienz bei einer Photoperiode von 14 h für die Bildung von Lutein und 16 h für β -Carotin und Astaxanthin erreicht werden.

Nach Bohne und Linden (2002) hängt die Akkumulation von Carotinoiden von Faktoren wie z. B. der genotypischen Veranlagung, der Biosynthese von Chlorophyllen, vom Aufbau des Photosyntheseapparates ab. Dies konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide Mikroalgenpezies prinzipiell ähnlich auf die unterschiedlichen Photoperioden und den damit verbundenen Konsequenzen wie Nährstoff- und Lichtlimitierung in Bezug auf die Carotinoidsynthese reagierten. Für eine hohe Produktion dieser Carotinoide sollte anhand der in dieser Arbeit eingestellten Parameter eine Anpassung des Nährmediums hinsichtlich der Verfügbarkeit von Nährstoffen, aber auch der spektralen Zusammensetzung der Lichtquelle erfolgen, um die Effizienz zu erhöhen. *S. obliquus*-Zellen enthielten zwar höhere Gehalte an Carotinoiden als *C. vulgaris*-Zellen, jedoch war der volumetrische Ertrag durch die geringeren Zellzahlen am Ende der Versuche mit *S. obliquus* für beide Spezies ähnlich. Daher kann kein eindeutiger Vorteil für die präferierte Nutzung einer Mikroalgenpezies für die Produktion dieser Carotinoide festgestellt werden.

5.3.4 Fettsäuregehalt

Fettsäuren sind Carbonsäuren und können entsprechend der Anzahl ihrer Doppelbindungen gesättigt (0 Doppelbindungen, SFA), einfachungesättigt (1, MUFA) und mehrfachungesättigt (≥ 2 , PUFA) synthetisiert werden. Ähnlich wie bei höheren Pflanzen kommen am häufigsten Fettsäuren mit C16 und C18 Struktur vor, die gesättigt oder einfachungesättigt sind (Becker 1994, Xu und Beardall 1997). MUFA und SUFA werden *de novo* in den Chloroplasten synthetisiert, während daraus PUFA am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Elongasen und Desaturasen gebildet werden (Huerlimann et al. 2014). Nach Hu et al (2008) werden Fettsäuren unter nicht limitierenden Bedingungen hauptsächlich für die Veresterung von Glycerol-basierenden Membranlipiden gebildet, welche ca. 5–20 % vom Zellgewicht ausmachen.

Hauptmembranlipide sind Glycolipide wie z. B. Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in der Chloroplastenmembran und Phosphoglyceride, welche überwiegend in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Membransystem vorkommen (Guckert und Cooksey 1990). Die Hauptbestandteile von MGDG in Grünalgen sind ω -3-Fettsäuren wie α -Linolensäure (C18:3 ω 3) (Erwin 1973). Nach Sahu et al. (2013) sind Palmitinsäure (PA, C16:0, ω -9-Fettsäure), Ölsäure (OA, C18:1, ω -9-Fettsäure) und Linolsäure (C18:2, ω -6-Fettsäure) die dominierenden Fettsäuren in Mikroalgen der Klasse der Chlorophyceae (von den Autoren wurde auch *Chlorella* sp. zugeordnet). Die einzelnen Fettsäuren besitzen für verschiedene Nutzungsbereiche eine unterschiedliche Bedeutung. So ist für die Biodieselproduktion ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren geeignet, während ein hoher Anteil von PUFA für die Verwendung in Aquakulturen oder Nahrungsergänzungsmitteln das Ziel ist (Fernandes et al. 2016). Daher ist es wichtig, das Verständnis für die spezifischen Reaktionsmuster zu erweitern, um die Produktion an das Produktionsziel anpassen zu können.

Faktoren, die das quantitative und qualitative Lipidprofil beeinflussen sind neben der Photoperiode und der spektralen Zusammensetzung u. a. die Temperatur, der physiologische Zustand der Algen, der pH-Wert, sowie die CO₂-Verfügbarkeit, aber auch eine Nitrat-, Phosphat- und Schwefellimitierung und hohe Salzgehalte (Guckert und Cooksey 1990, Reitan et al. 1994, Thompson 1996, Rao et al. 2007, Hu et al. 2008, Li et al. 2008, Santos et al. 2012).

Im Rahmen der Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Auswertung auf die Fettsäuren LA und ALA sowie Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6 ω 3) begrenzt. Unter Berücksichtigung der überprüften und veränderten Parameter Photoperiode, spektrale Zusammensetzung der Lichtquelle, UV- und Mikrowellenstrahlung, sowie den Nitratgehalt und die CO₂-Verfügbarkeit werden die Ergebnisse im Folgenden auf die Ergebnisse der untersuchten Fettsäuren diskutiert.

Temperatur

Die Temperatur wurde durch die Kultivierung im Wasserbecken bei 26,5 °C (\pm 1 K) konstant gehalten. Durch Mikrowellenbehandlung erhöhte sich diese nur kurzzeitig, wodurch keine signifikante Veränderung der untersuchten Fettsäuren nachgewiesen wurde. Prinzipiell steigt mit zunehmender Temperatur die Tendenz zu einem Anstieg der Sättigung der Fettsäuren, was eine höhere Stabilität der Membranen bewirkt (Hu et al. 2008). Da die Temperatur in den Versuchen konstant gehalten wurde, wird ein Temperatureffekt nicht weiter diskutiert.

Nitratgehalt und Licht

Im Rahmen der Versuche konnte eine Stickstofflimitierung mit Zunahme der Photoperiode bzw. durch zunehmende Zellzahl gezeigt werden. Daher muss der Einfluss dieser beiden Faktoren im Zusammenhang diskutiert werden.

Nach Hu et al. (2008) ist Stickstoff unter den Nährstoffen der kritischste Parameter im Lipidstoffwechsel. Unter nicht-N-limitierenden Bedingungen sinkt der Gesamtlipidgehalt auf ca. 20 % und es werden vorrangig polare Membranlipide gebildet (Hu et al. 2008).

Unter suboptimalen Bedingungen wie z. B. Stickstofflimitierung erfolgt eine Umstellung des Lipidstoffwechsels von Membran- zu Speicher-/ Neutrallipiden. Dabei werden vorrangig Triglyceride (TAG) mit bis zu 20–50 % Anteil an der BTM als Energie- und Kohlenstoffspeicher gebildet, die vor allem MUFA und SUFA eingelagert haben (Hu et al. 2008). Die Synthese von TAG kann der Algenzelle als unspezifische Antwort auf Stress helfen, da die Synthese dieser Lipide wie eine Elektronensenke unter photooxidativen Stress wirkt und mehr NADPH zur Synthese benötigt wird. Die TAG-Synthese ist zudem häufig assoziiert mit der Synthese von Carotinoiden, da β -Carotin, Lutein und Astaxanthin mit TAG verestert und in carotinoidreichen Lipidkörpern im Cytoplasma eingelagert werden können. (Hu et al. 2008) Diese Lipidkörper können als Schutz der Chloroplasten bei hoher Bestrahlungsintensität durch die Absorption der Strahlung dienen. Eine Zunahme dieser Carotinoide, die auf eine Einlagerung in den Lipidkörperchen deutet, konnte in den Versuchen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die prinzipielle Bildung dieser Lipidtröpfchen lässt sich aber anhand der mikroskopischen Überprüfung und der Gelbfärbung der Kulturen bestätigen, welche in den Varianten mit hoher Zunahme der Zellzahl (Belichtungsdauer ≥ 20 h und in der CO₂-Variante) beobachtet wurde.

Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure

Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6 ω 3) sind biologisch sehr aktive Fettsäuren und gehören zu den sehr langen PUFA (VLC-PUFA). Nach Swanson et al. (2012) weisen diese Fettsäuren noch bedeutsamere, gesundheitsfördernde Effekte als Linol- (LA) und α -Linolensäure (ALA) auf. EPA kann durch Elongasen und Desaturasen aus ALA gebildet werden. Durch weitere Elongase- und Desaturaseaktivität und abschließende peroximale β -Oxidation kann schließlich DHA entstehen. (Mühlroth et al. 2013, Fernandes et al. 2016) Obwohl nach Winwood (2013) in autotrophen Mikroalgen EPA und DHA überwiegend in Thylakoidmembranen vorkommen und damit Licht einen entscheidenden Faktor bei der Produktion ausmacht, konnte in keiner Probe EPA und DHA nachgewiesen werden. Das heißt, dass die Synthesewege bzw. entsprechende Elongasen und Desaturasen für diese Fettsäuren nicht (ausreichend) exprimiert oder aktiviert werden konnten, obwohl ALA als Vorläuferfettsäure zu den dominierenden Fettsäuren in allen Proben bestimmt wurde. Huerlimann et al. (2014) wiesen neben einer spezies-spezifischen Ausprägung der Synthese dieser Fettsäuren auch eine Abhängigkeit von der Wachstumsphase und der Stickstofflimitierung nach. So zeigten die von den Autoren untersuchten Mikroalgenarten u. a. einen reduzierten Gehalt dieser Fettsäuren in der stationären Phase. Da der DHA- und EPA-Gehalt in *C. vulgaris* und *S. obliquus* nur am Ende der Versuche dieser Arbeit bestimmt wurde, kann ein höherer Gehalt in den Zellen während der exponentiellen Phase nicht ausgeschlossen werden. In dieser Wachstumsphase werden vor allem Membranlipide gebildet in denen PUFA wie DHA und EPA eingebaut werden. Nach Huerlimann et al. (2010) variiert die Fettsäurenzusammensetzung jedoch stärker in Abhängigkeit der Spezies, als durch die Kultivierungsbedingungen und die Wachstumsphase. Die speziesabhängige Bildung dieser VLC-PUFA konnte auch nach Untersuchungen von Lang et al (2011) an 2000 Spezies der Sammlung von Algenkulturen Göttingen dargestellt werden. DHA und EPA wurden in dieser Studie in Klassen wie Dinophyta, Haptophyta und Bacillariophyta nachgewiesen.

Nach Boelen et al. (2013) sind vor allem auch Mikroalgen aus polaren Regionen in der Lage, hohe Mengen an EPA und DHA zu bilden, um eine Membranfluidität unter den klimatischen Bedingungen zu gewährleisten. *C. vulgaris* und *S. obliquus* stellen daher wahrscheinlich keine geeigneten Kandidaten zur Produktion dieser Fettsäuren dar. Zudem können auch das verwendete Nährmedium und die eingestellten Produktionsparameter nicht geeignet gewesen sein, um die Synthese zu fördern. Nach Sahu et al. (2013) konnte jedoch in nicht weiter bezeichneten *Chlorella* Spezies auch DHA (mit 8,90 %) und EPA (mit 3,24 %) nachgewiesen werden. Dies könnte auf die spezies-spezifische Ausprägung der Synthese oder förderliche Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein, die jedoch von den Autoren nicht genau erläutert wurden.

Linol- und α -Linolensäure

LA und ALA gehören zu den Vertretern der essentiellen Fettsäuren, die nicht vom menschlichen Stoffwechsel selber synthetisiert werden können, aber für die Funktion verschiedener Prozesse benötigt werden und somit mit der Ernährung aufgenommen werden müssen. Neben Palmitinsäure waren sie die Hauptfettsäuren in beiden untersuchten Algenarten. Dabei wiesen *S. obliquus*-Zellen höhere ALA-Gehalte als *C. vulgaris*-Zellen auf.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass durch die Zunahme der Zellzahl mit der Photoperiode auch die Nährstoffe und Licht zunehmend limitiert waren. Die Ergebnisse deuten bei *C. vulgaris*-Zellen auf eine Zunahme des LA-Gehalt und eine nicht signifikante Abnahme des ALA-Gehaltes mit der Zunahme der Photoperiode bzw. Zellzahl an. Der zelluläre ALA-Gehalt wies in *S. obliquus*-Zellen dagegen keine Abhängigkeit zur Photoperiode und Zellzahl auf. Auf Grund der geringen Stichprobenzahl der 20:4-h-Variante und der fehlenden Analysen der 22:2-h-Variante konnte eine abnehmende Tendenz mit Zunahme der Photoperiode jedoch nicht statistisch abgesichert werden.

Aus Untersuchungen von Piorreck et al. (1984) ging hervor, dass bei geringen N-Gaben (<0,001–0,003 % KNO₃) eher Neutrallipide eingelagert und der Gehalt an polaren Lipiden in *C. vulgaris* und *S. obliquus* sank. Je weniger Stickstoff den Algen zur Verfügung stand, desto ungesättigter waren die Fettsäuren. Bei höheren KNO₃-Gaben ($\geq 0,01$ –0,10 %) stieg der Anteil polarer Lipide. Nach den Autoren nimmt der Gehalt an gesättigten Fettsäuren mit Abnahme der Membranlipide und mit Zunahme der Neutrallipide in nährstofflimitierten Kulturen zu. Dies bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit von *C. vulgaris*-Kulturen, die ein steigendes LA- zu ALA-Verhältnis in den Varianten mit zunehmender Dauer der Photoperiode aufwiesen und somit auf eine verstärkte Synthese gesättigterer Fettsäuren als ALA hindeuten. Wie in der Abb. 47 dargestellt ist, entsteht Linolsäure durch enzymatische Einführung einer Doppelbindung aus Ölsäure durch die Δ -12-Desaturase. Das verschiedene Faktoren, wie die Verfügbarkeit von Makro- und Mikronährstoffen, die Aktivität von Fettsäurenelongasen und -desaturasen beeinflussen, konnte bereits durch verschiedene Studien nachgewiesen werden (Das 2006, Fernandes et al. 2016). So wiesen Untersuchungen von Feng et al. (2011) und Kaye et al. (2015) eine verminderte Expression der Desaturasen bei einer Stickstofflimitierung, die zu einer zunehmenden Sättigung der Fettsäuren mit zunehmender Nährstoffknappheit nach.

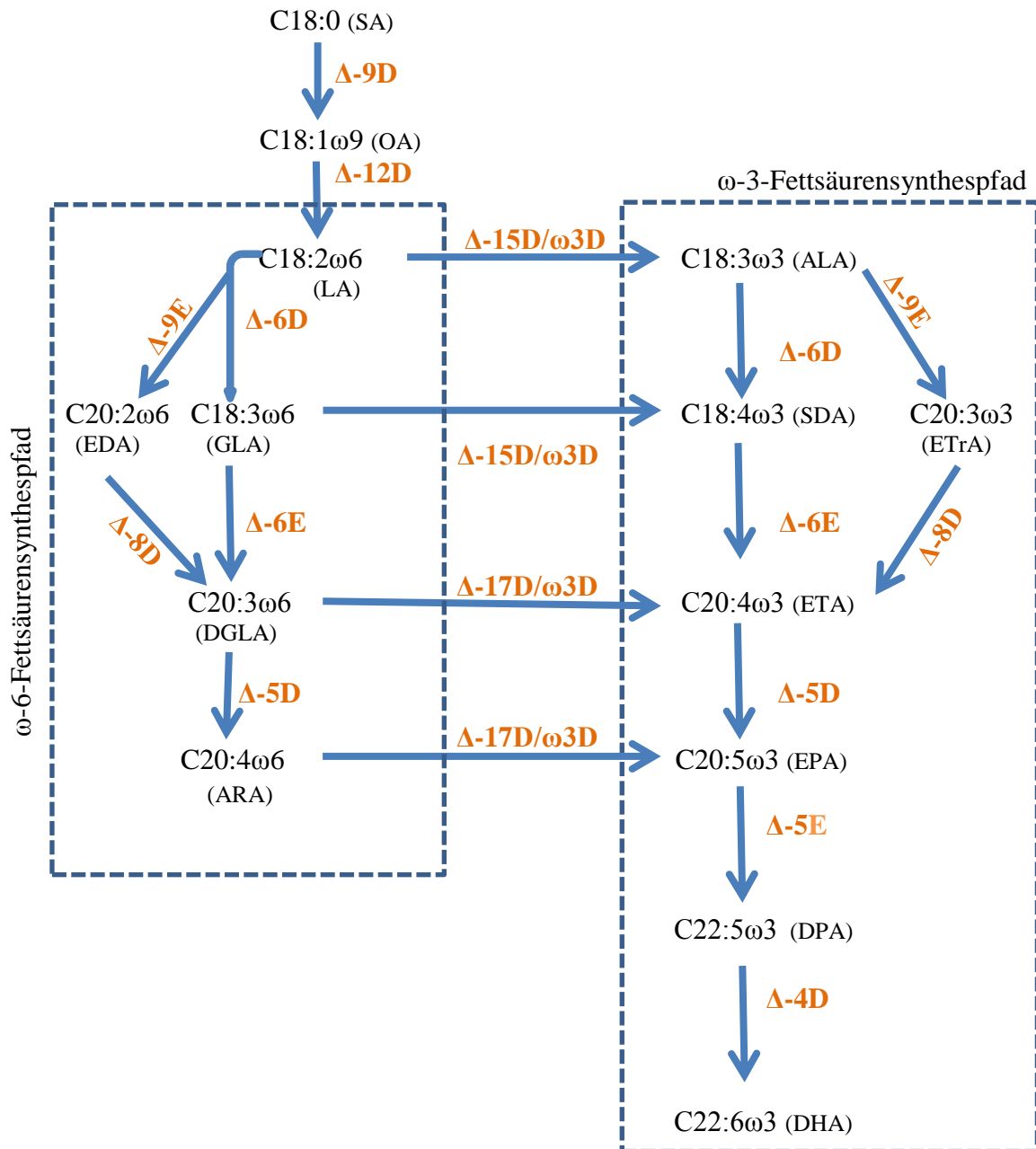


Abb. 47: Fettsäurebiosynthesewege in Mikroalgen (nach Huerlimann et al. 2014, Kaye et al. 2015 und Fernandes et al. 2016); E = Elongase, Δ -xD = Desaturase, SA = Stearinsäure, OA = Ölsäure, LA = Linolsäure, GLA = γ -Linolensäure, DGLA = Dihomogammalinolensäure, ARA = Arachidonsäure, EDA = Eicosadiensäure, ALA = α -Linolensäure, SDA = Steraridonsäure, ETA = Eicosatetraensäure, EPA = Eicosapentaensäure, DPA = Docosapentaensäure, DHA = Docosahexaensäure, ETrA = Eicosatetriensäure

So können die Ergebnisse für die LA- und ALA-Konzentration in den Zellen dieser Arbeit z. B. auch auf eine durch die Stickstofflimitation induzierte verminderte Δ -15-Desaturaseaktivität zurückzuführen sein, wodurch LA nicht durch Einführen einer Doppelbindung in ALA überführt werden konnte. Auch eine verminderte Aktivität von Δ -6 Desaturase könnte diesen Effekt verursachen, wodurch keine weitere Doppelbindung in LA oder ALA eingefügt werden konnte und der Grad der Unsättigung dadurch nicht stieg. Die Auswertung des LA/ALA-Verhältnisses für *S. obliquus*-Kulturen ergab keine eindeutige Abhängigkeit von der Photoperiode bzw. Zellzahl.

Da das Verhältnis im Gegensatz zu *C. vulgaris*-Kulturen jedoch immer unter 1 lag, scheint die Enzymaktivität stärker zum Synthesepfad von ω -3-Fettsäuren gerichtet zu sein als zum ω -6-Synthesepfad. Die größeren Veränderungen des Fettsäurenverhältnisses in *C. vulgaris*-Zellen kann zusätzlich auf eine höhere Sensibilität des Enzymsystemes in *C. vulgaris* bzw. eine höhere Stabilität in *S. obliquus* hinweisen.

Kaye et al. (2015) wiesen in *Nannochloropsis oceanica* eine verstärkte Anreicherung von Ölsäure und eine Reduzierung des LA-Gehaltes in Kulturen unter Stickstoffknappheit nach. Die Autoren vermuten, dass die verminderte Expression von Desaturasen unter Stickstoffknappheit insbesondere die Δ -12-Desaturaseaktivität beeinflusst. Da der LA-Gehalt in beiden Kulturen dieser Arbeit trotz mit der Photoperiode zunehmender Stickstofflimitierung sich jedoch nicht reduzierte, ist nicht von einer verminderten Δ -12-Desaturaseaktivität durch Stickstoffknappheit in *C. vulgaris* und *S. obliquus* auszugehen. Nach Shanklin und Cahoon (1998) gibt es jedoch zwei verschiedene Δ -12-Desaturasen, die entweder am ER und/oder im Chloroplast aktiv sind und unterschiedliche Substrate nutzen. So könnte die Stickstoffverfügbarkeit die verschiedenen Δ -12-Desaturasen auch unterschiedlich beeinflussen. Die Untersuchungen von Kaye et al. (2015) können jedoch durch die Ergebnisse des Nitratversuches bestätigt werden. Dabei wiesen die *C. vulgaris*-Zellen der Nitrat-Variante die höchsten LA- und geringsten ALA-Konzentrationen auf, sodass sich auch das Fettsäurenverhältnis im Vergleich zur Kontrollvariante von 1,9 auf 3,1 erhöht hat. Dies deutet auf eine stickstoffinduzierte, erhöhte Δ -12-Desaturaseaktivität bzw. auf eine erhöhte *de novo* Synthese von Vorläuferfettsäuren wie Palmitin und Ölsäure in den Chloroplasten hin. Dies bestätigt auch die bisherigen Ergebnissen der Arbeit, die eine Reduzierung der Desaturasen- und Elongasenaktivität durch die Stickstofflimitierung vermuten lassen. Da im Vergleich zur Dauerlichtkontrolle keine Gelbfärbung der Kulturen beobachtet werden konnte, erfolgte keine oder deutlich reduzierte Einlagerung von Speicherlipiden im Vergleich zur Dauerlichtkontrolle mit dem Standardmedium. Dies bestätigt die bisherigen Erkenntnisse, dass eine Stickstofflimitierung die Einlagerung dieser Lipide induziert. Es ist zu berücksichtigen, dass die Daten aus einem Versuch gewonnen wurden. Weitere Wiederholungsversuche sind daher notwendig, um die Ergebnisse des Nitratversuches zu validieren.

Ein Teil der Ergebnisse der Fettsäuren in den Zellen der UV-Versuche kann vermutlich auch durch die Stickstoffabhängig erklärt werden. Mit UV-Strahlung behandelte Zellen wiesen ein geringeres LA/ALA-Fettsäurenverhältnis, aber auch zum Teil geringere Biomasseerträge und Zellzahlen auf. Dadurch lagen die Medienbestandteile vermutlich weniger limitiert vor, sodass die Fettsäuresynthese stärker zu ALA gerichtet war im Vergleich zur Fettsäuresynthese in den Kontrollkulturen. Da die Medienbestandteile jedoch nicht überprüft wurden, ein verringertes LA/ALA-Verhältnis in den Zellen mit im Vergleich zur Kontrolle ähnlichen Biomasseerträgen und Zellzahlen gezeigt wurde und sich die absolute Konzentration der Fettsäuren in den Zellen sowohl erhöhte als auch reduzierte, können weitere Einflüsse durch UV-Strahlung nicht ausgeschlossen werden.

Nach Sukenik und Livne (1991) kann durch eine verbesserte Stickstoffverfügbarkeit auch eine erhöhte Aktivität und Expression von Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) induziert werden. Dies würde nach den Autoren eine verstärkte *de novo* Fettsäuresynthese

induzieren und möglicherweise auch den höheren Anteil von LA in der Nitrat-Variante mit *C. vulgaris* erklären. Die enzymatische Umwandlung in nachfolgende Fettsäuren von LA kann durch die Dauerbelichtung als Stressor inhibiert worden sein, sodass sich LA eher in den Membranlipiden anreicherte und somit in der Thylakoidmembran eingebaut wurde. Dies kann auch zu einer erhöhten Stabilität bzw. Festigkeit der Membran führen. Da der Chlorophyll- und Proteingehalt, aber auch der β -Carotin- und Luteinanteil bei den Zellen mit zusätzlich Nitrat im Medium signifikant größer war im Vergleich zu Zellen der Kontrolle, kann dies auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Thylakoidmembran, in der mehr Protein-Chlorophyllkomplexe eingebaut sind, deuten (Seyfabadi et al. 2011, Garcia-Camacho et al. 2012, Nikolaou et al. 2016). Spezifische molekularbiologische Untersuchungen können dazu weitere Aufklärung geben.

Der Einfluss der spektralen Zusammensetzung auf die Fettsäuresynthese konnte LED-belichteten Zellen nachgewiesen werden. Dabei verschob sich das LA/ALA-Verhältnis von 1,55 auf 0,87 im Vergleich zu 20:4-h Kontrolle. Auf Grund des erhöhten Anteils von ALA in Zellen der LED-Belichtung im Vergleich zu Zellen in der 20:4-h Kontrolle, ist davon auszugehen ist, dass die Synthese von ALA durch die spektrale Zusammensetzung der LED stimuliert bzw. die Synthese vom ω -6-Synthesepfad von LA in den ω -3-Fettsäurepfad zu ALA gerichtet wurde. Entsprechende Enzyme, wie z. B. Δ -15-Desaturase, könnten durch die spezifischen Wellenlängen aktiviert worden sein. Diese wellenlängenabhängige Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung konnte auch in Untersuchungen von Pérez-Pazos und Fernández-Izquierdo (2011) gezeigt werden.

Zusammenhang zum Chlorophyll- und Proteingehalt

Die Ergebnisse von Piorreck et al. (1984) bestätigen auch die nitratabhängigen Ergebnisse des Protein- und Chlorophyllgehaltes dieser Arbeit. Die Reduktion des Protein- und Chlorophyllgehaltes mit Zunahme der Dauer der N-Limitierung in *C. vulgaris* und *S. obliquus* deuten an, dass das Chloroplasten- bzw. Thylakoidmembransystem abgebaut wurde. Dadurch freiwerdende Verbindungen und Moleküle wie Stickstoff und Fettsäuren könnten dann zum Aufbau der Neutrallipide verwendet werden. Da PUFA Hauptbestandteile von Thylakoidmembranen darstellen, ist eine Zunahme des PUFA-Gehaltes häufig gekoppelt mit der Zunahme an Thylakoidmembranlipiden (Renaud et al. 1991). Durch die Konformation und Gestaltung dieser Membrane (Art der Stapelung und Transparenz) und damit auch durch das Protein/Lipidverhältnis in dieser Membran, kann die effiziente Rate zur Lichtsammlung pro Chl a-Molekül reduziert werden und die Photosyntheserate beeinflussen (Berner et al. 1989). Die signifikant positive Korrelation zwischen dem ALA- und dem Chl a-Gehalt lässt eine wichtige Bedeutung dieser Fettsäure in der Thylakoidmembran von *C. vulgaris* vermuten und bestätigt die Bedeutung dieser Fettsäure in diesen Membranlipiden. Für *S. obliquus* konnte dagegen keine Korrelation zwischen dem Chl a-Gehalt und ALA bzw. auch zu LA in Abhängigkeit der Photoperiode bzw. Zellzahl nachgewiesen werden, obwohl sich eine Abhängigkeit des Chl a-Gehaltes zur Photoperiode andeutet. Dies könnte auch durch die geringe Stichprobenzahl der 20:4-h-Variante und der fehlenden Daten von 22:2-h-Variante und den allgemeinen hohen Schwankungsbereichen der Analysenergebnisse verfälscht worden sein.

In *S. obliquus* stieg der absolute Gehalt an LA mit Zunahme der Photoperiode und damit auch mit der Dauer der Nitratlimitierung. Die Abnahme des relativen und absoluten Protein- und Chlorophyllgehaltes deuten auch auf den Abbau der Chloroplastenmembran an. Dies kann andeuten, dass ALA für den Aufbau der Thylakoidmembran in *S. obliquus*-Zellen nicht so bedeutend wie in *C. vulgaris*-Zellen ist.

Einfluss CO₂

Die Gelbfärbung der CO₂-Kulturen wurde vermutlich durch die Einlagerung von Speicherlipiden verursacht, welche vorrangig gesättigte und einfachgesättigte Fettsäuren enthalten. Dadurch kann auf eine verminderte Desaturaseaktivität oder geringere Expressierung der Desaturasen geschlossen werden. Dies würde auch die Ergebnisse und Entwicklung des LA- und ALA-Gehaltes in *C. vulgaris* bekräftigen, da auch hier eine zunehmende Gelbfärbung mit Zunahme der Photoperiode (mit Ausnahme der Nitratvariante) und damit die Einlagerung von Lipiden beobachtet werden konnte. In diesen Kulturen wurde entsprechend weniger ALA nachgewiesen. Zwar wiesen die Zellen, die mit zusätzlich CO₂ kultiviert wurden die höchste LA- (mit Ausnahme zur Nitrat-Variante) und die höchste ALA-Konzentration in den Zellen auf, jedoch war der relative Anteil nur von ALA im Vergleich zu den Versuchen mit unterschiedlicher Photoperiode bei einer Belichtungszeit von ≥ 20 h geringfügig erhöht. Dies deutet auf eine Einlagerung von Verbindungen in Form von Speicherstoffen hin, die das Zellgewicht erhöhten, welche jedoch überwiegend nicht aus LA und/oder ALA bestanden und somit andere Fettsäuren in den Speicherlipiden eingelagert wurden. Da sich bei der CO₂-Variante mehrere Faktoren wie die C-Verfügbarkeit, der niedrigere pH-Wert, die höhere Lichtintensität und die stärkere Konkurrenz um Nährstoffe im Vergleich zu Kulturen ohne zusätzlich CO₂ unterschieden, können die Veränderungen multifaktoriell bewirkt worden sein.

Auch Tsuzuki et al. (1990) wiesen in mit zusätzlich CO₂-angereicherter Luft begasten *C. vulgaris*-Zellen im Vergleich zu nur mit Umgebungsluft begasten Zellen einen deutlich erhöhten Anteil von LA nach. Zusätzlich verschob sich das Verhältnis von LA- zu ALA von 0,58 auf 2,24. Da sich dieses Verhältnis in Galactolipiden wie MGDG und DGDG stärker veränderte als in anderen Lipiden, schlussfolgerten die Autoren auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Thylakoidmembran als Anpassung zur Aufnahme von CO₂. Dies führen diese Autoren auf eine einfachere Diffusion von CO₂-Molekülen durch eine Membran, je ungesättigter die Fettsäuren sind. Dies bringt den Zellen einen Vorteil bei geringen CO₂-Konzentrationen im Medium. Durch den hohen pH-Wert in den Versuchen dieser Arbeit ohne zusätzlich CO₂, befanden sich mehr Hydrogencarbonationen im Medium, welche nicht passiv die Membranen durchdringen können. Daher ist dieser Effekt bei diesen Varianten vermutlich weniger beeinflussend gewesen, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchung der Vorkommens der Fettsäuren erfolgte, können auch keine Rückschlüsse auf die Veränderungen des Fettsäurenmusters spezifischer Membrane getroffen werden.

Einfluss pH-Wert

Nach Santos et al. (2012) kann ein hoher alkalischer pH-Wert eine Anreicherung von TAG und gleichzeitig zu einer Abnahme von polaren Membranlipiden auf Grund der Inhibierung des Zellzykluses führen. Die Autoren wiesen in der untersuchten Algenart *Nannochloropsis oleoabundans* bei einer Kultivierung mit einem pH-Wert von 10 eine erhöhte Konzentration gesättigter Fettsäuren, aber auch von LA nach. Aussagen zur Desaturaseaktivität erfolgten nicht. Jedoch würde auch dies die Interpretation der pH-Wert-Abhängigkeit der Enzymaktivität unterstützen. Das bedeutet, dass bei einem hohen pH-Wert eine geringere Δ -6- und Δ -15-Desaturaseaktivität zu einem Anstieg von gesättigteren Fettsäuren als LA führt und dagegen bei einem neutraler pH-Wert, wie in den CO₂-Versuchen, eine höhere Δ -15-Desaturaseaktivität induziert wird. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der ALA-Konzentration trotz Stickstofflimitierung. Der über dem spezie-spezifischen Optimum hohe pH-Wert zwischen 9 und 10 während der Kultivierung von *C. vulgaris* und *S. obliquus* in den Versuchen dieser Arbeit, kann somit die Veränderungen des Fettsäurenusters bzw. -anteils/gehaltenes direkt und indirekt beeinflusst haben. Diese pH-Wert Erhöhung war zwar in allen Kulturen bei jeder Behandlung zu beobachten, jedoch können verschiedene Faktoren wie z. B. hoher pH-Wert und Dauer der Stickstofflimitierung in Wechselwirkung getreten sein.

Ertrag und Lichtnutzungseffizienz

Die Summe der beiden untersuchten Fettsäuren wies keine Unterschiede zwischen den Belichtungsvarianten 20:4-h, 22:2-h, 24:0-h und der LED-Variante in *C. vulgaris* und zwischen den unterschiedlich belichteten Kulturen von *S. obliquus* auf. Die Nitrat-Variante wies dabei den höchsten Gesamtgehalt der beiden Fettsäuren mit ca. 5 % der Biotrockenmasse auf. Der volumetrische Ertrag war bei *C. vulgaris* für beide Fettsäuren mit zusätzlich CO₂ am höchsten. Bezogen auf die Varianten ohne zusätzlich CO₂ war für die Linolsäureproduktion der Ertrag mit zusätzlich Nitrat am höchsten, gefolgt von der 22:2-h Variante. Diese Varianten waren auch bezogen auf die eingesetzte Lichtenergie am effektivsten. Da der volumetrische Ertrag durch die erhöhte Nitratkonzentration erhöht werden konnte, sollte dies mit anderen Photoperioden geprüft werden. Für ALA ergab sich der höchste volumetrische Ertrag durch die LED-Belichtung, während die Varianten mit Leuchtstoffröhren als Belichtungsquelle untereinander keinen Unterschied im Ertrag aufwiesen. Daher war die Lichtenergienutzung zur Fettsäuresynthese durch die LED am höchsten. Eine Erhöhung der Belichtungsdauer führte trotz Erhöhung der Zellzahl und Biomasse zu keiner Erhöhung des Ertrages.

Bei *S. obliquus* ergaben sich unter Berücksichtigung der fehlenden Daten für die 22:2-h-Variante die höchsten volumetrischen Erträge für LA gleichermaßen durch die Dauerbelichtung und mit einer Photoperiode von 20 h und für ALA ebenfalls mit 20 h, wodurch auch bezogen auf die Lichtnutzungseffizienz die Produktion für LA und ALA mit dieser Belichtungsdauer am effizientesten. Die Ergebnisse der LED-Belichtung konnten zudem zeigen, dass dies eine energetisch günstige Möglichkeit darstellt, das Fettsäurenmuster zu beeinflussen. Inwiefern diese auch auf andere Mikroalgenarten übertragbar ist, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

5.3.5 Weitere Inhaltsstoffe

Die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse der untersuchten Inhaltsstoffe konnte nicht abschließend klären, welche Verbindungen zur Erhöhung des Zellgewichtes führten. Die optischen und makroskopischen Veränderungen lassen aber die bereits erwähnte Einlagerung von Lipiden und Kohlenhydratspeicher vermuten. Nach Siaux et al. (2011) besteht eine Konkurrenz zwischen der Lipid- und Stärkesynthese. Die Autoren schlussfolgern, dass Stärke zuerst als Energiereservestoff eingelagert wird und die Lipidsynthese als Langzeitspeicher im Anschluss erfolgt und Proteine für diesen Prozess abgebaut werden. Die Autoren konnten dabei eine Beziehung zur Dauer des Stickstoffmangels mit der Art der Speicherstoffe nachweisen. Daher kann über die Dauer der Stickstofflimitierung die Einlagerung dieser energiereichen Verbindungen manipuliert werden. (Siaux et al. 2011, Ho et al. 2012)

5.4 sonstige Ergebnisse

5.4.1 Axenische Kulturen

Die von der GMBU e.V. Halle zur Verfügung gestellten Algenstämme waren nicht axenisch, das heißt nicht frei von Bakterien. Jedoch konnten keine Spuren von Pilzen nachgewiesen werden. Um spezifische Einflüsse auf eine Kultur zu untersuchen, sollten diese idealerweise axenisch sein. Es wurden Versuche unternommen, axenische Mikroalgenkulturen durch Ausstreichen auf speziellen Agarmedien zu erhalten (Ziegler 2013). Jedoch war es nicht möglich, bakterienfreie Kulturen herzustellen. Eine mit Bakterien kontaminierte Kultur muss jedoch nicht nachteilhaft sein. So kann eine Bakterienkultur auch Vitamine und andere Wachstumsfaktoren bereitstellen. Somit kann diese Symbiose positiv durch den Austausch von CO₂ und O₂ wirken (Lorenz et al. 2005, Ramanan et al. 2016). Der Zustand der Kulturen wurde durch regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen überprüft und das Nährmedium durch abzentrifugieren des alten Mediums und Austausch durch neues Tamiya-Medium regelmäßig erneuert. Dadurch sollte auch die Anreicherung von sekretierten Substanzen der Algen ausgeschlossen werden.

5.4.2 Methodenvergleich zur Chlorophyllbestimmung

Nach MacIntyre und Cullen (2005) dient die Bestimmung des Chl a-Gehaltes als guter Indikator für das Wachstum. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass dies nicht für alle Wachstumsphasen und Kultivierungsbedingungen nur bedingt anwendbar ist, wie z. B. die Auswertung der Nitrat-Variante zeigte. Der Vergleich der Ergebnisse der Chlorophyllkonzentration in den Zellen aus gefriergetrockneten Proben und den methanolischen Extrakten konnte darstellen, dass insbesondere bei *C. vulgaris* ein höherer Gehalt an Chl a in den methanolischen Extrakten in den Zellen vorliegen sollte. Dies kann durch eine Interferenzüberlappung des Chlorophyll a-Gehaltes durch die Überlappung der Absorptionsbereiche mit anderen Pigmenten bei den spektralphotometrischen Messungen verursacht werden (MacIntyre und Cullen 2005). So ergeben sich durch diesen Einfluss scheinbar höhere Chl a-Konzentrationen. Für Chl b ergaben sich keine so deutlichen Abweichungen zwischen den Untersuchungsmethoden. Tendenziell waren die Ergebnisse der methanolischen Extrakte jedoch vergleichbar mit denen der durch HPLC ermittelten Daten

(Anhang A 11, S. 168). Somit eignet sich die Methode prinzipiell, um die Chlorophyllentwicklung während der Kultivierung zu überwachen. Dabei müssen spezie-spezifische Anpassungen (wie z. B. Erwärmungsschritte, Inkubationszeit im Lösungsmittel) an die Extraktionsmethode erfolgen. Methanol erwies sich als geeignetes Extraktionsmittel, da andere Lösungsmittel wie Ethanol und Aceton geringere Extraktionsergebnisse der Zellen aufwiesen. Faktoren wie eine bspw. hohe Zellzahl und das Alter der Zellen beeinflussen das Extraktionsergebnis, wodurch es zu unvollständigen Extraktionen kommen kann. Die Proben verblieben zum Teil gelblich bzw. grünlich. Da die Auswertung der Pellets im Hinblick auf den Extraktionsgrad auch nur visuell entschieden wird, kann durch diesen methodischen Fehler das Ergebnis verfälscht werden. Daher ist eine verfahrensmethodische Diskussion und Untersuchung zur Anwendung dieser Methoden im Einzelfall notwendig. Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen unterschiedlicher Chlorophyllbestimmungsmethoden können sich durch Einflüsse bei beiden Methoden auf die Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe auswirken. Bei beiden Methoden kommt hinzu, dass für eine Diskussion des zellulären Gehaltes eine Rückrechnung über die ermittelte Biomasse und Zellzahl erfolgt. Dabei können weitere Bestimmungsfehler mit eingehen.

5.4.3 Optische Dichte als Wachstumsindikator

Die optische Dichte ist eine einfache und schnelle Methode, um Rückschlüsse auf den Zustand einer Kultur zu erhalten und nach Myers et al. (2013) auch unter gewissen Voraussetzungen eine geeignete Methode zur Bestimmung der Biomasse. Ausgehend von den Datensätzen zur Veröffentlichung 4 wurde eine gute lineare Abhängigkeit zwischen der optischen Dichte und der korrespondierenden Zellzahl für *C. vulgaris* mit einem Korrelationskoeffizient von 0,97 und 0,94 für *S. obliquus* ermittelt (Anhang A 12, S. 169). Dies deutet auf eine hohe Abhängigkeit zwischen den Parametern hin. Einzelne Messungen zeigten dagegen eine steigende optische Dichte bei konstanter Zellzahl. Dies deutet darauf hin, dass weitere Faktoren wie z. B. das steigende Zellvolumen, die Dicke der Zellwand oder die Zusammensetzung der Zelle die Bestimmung der optischen Dichte beeinflussen, obwohl alle Messungen im linearen Bereich des Photometers erfolgten. Chlorophyll und andere Pigmente werden einen geringen Einfluss auf dieses Ergebnis bewirken, da die Messung der OD bei einer Wellenlänge von 750 nm erfolgte. Dies ist außerhalb der maximalen Absorption der meisten Pigmente (Griffiths et al. 2011b). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene Faktoren Ungenauigkeiten verursachen und einen unkorrekten Zustand der Kultur andeuten können. Zudem sind vergleichende Aussagen zur optischen Dichte zwischen verschiedenen Studien nicht möglich, da die Ergebnisse durch die Eigenschaften des Photometers, den Kultivierungsbedingungen und dem Zustand der zu detektierenden Zellen beeinflusst werden. Zudem wurde die optische Dichte auch bei Wellenlängen gemessen, die innerhalb des Absorptionsbereiches von Pigmenten liegen können. Die Absorption in diesem Bereich ist zwar schwach, jedoch ist eine Messung außerhalb des Absorptionsbereiches, d. h. über 720 nm sicherer. Weiterhin wird in vielen Untersuchungen eine Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Biomasse angegeben, sodass teilweise Biomasseergebnisse diskutiert werden, die auf Basis der optischen Dichte berechnet wurden. Auch dies ist kritisch zu beurteilen, auf Grund der individuellen Faktoren, die die optische Dichte beeinflussen können.

6 Ausblick

Mikroalgen sind für verschiedene Wirtschaftsbereiche von hohem Interesse, da das Anwendungspotential dieser nachwachsenden Rohstoffquelle über die derzeitigen Hauptanwendungsgebiete als Nahrungsergänzungsmittel und Futtermittel hinausgeht. Experimente mit verschiedenen Mikroalgenarten sind daher von zentraler Bedeutung, um die Reaktion auf verändernde Umweltreize zu verstehen.

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnten Grundlagen für ein besseres Verständnis der Reaktionswege in den Zellen gewonnen werden, die für eine optimierte Produktion genutzt werden können. Die Effekte auf den Biomassertrag und die Stoffwechselaktivität in *C. vulgaris* und *S. obliquus* durch die unterschiedlichen Photoperioden konnten nicht auf die Lichtdauer alleine zurückgeführt werden, da die Bedingungen im untersuchten Kultivierungssystem ein dynamisch veränderndes System durch den Anstieg der Zellzahl, den steigenden pH-Wert und der Nährstofflimitierung darstellte. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die verschiedenen Prozessparameter komplex miteinander wechselwirken (z. B. CO₂-Gehalt, N-Verfügbarkeit, pH-Wert, spektrale Zusammensetzung der Lichtquelle). Die Bestimmung des TLI erwies sich als eine Methode, um den jeweiligen Ertrag bewerten zu können. So konnte nachgewiesen werden, dass die Lichtnutzung i. d. R. mit Zunahme der Photoperiode sank. Die zusätzlich zugeführte Energie wurde demnach nicht effizient zum Stoffaufbau genutzt und ging dem System wahrscheinlich in Form von Wärme verloren. Das TLI sollte daher als Vergleich für unterschiedliche Studien und Methoden auf Basis des Lichteinsatzes genutzt werden.

Um die im Rahmen dieser Arbeit erreichten Ergebnisse zu validieren, müssen spezifische Wiederholungsversuche durchgeführt werden. Dazu sollte auch untersucht werden, inwieweit sich die photoautotrophe Vorkultivierung bei *C. vulgaris* auf das Wachstumsprofil und die biochemische Zusammensetzung auswirkt. Ein stabiler pH-Wert während der Kultivierung sollte für weitere Untersuchungen ebenfalls erreicht werden, um die Effekte eines alkalischen pH-Wertes über dem spezies-spezifischen Optimum ausschließen zu können. Bei Verwendung zusätzlicher CO₂-Anreicherung der Begasungsluft muss jedoch eine Anpassung des Nährmediums an die Zellzahlzunahme erfolgen, um Einflüsse durch Nährstoff-limitierungen reduzieren zu können. Dabei sollte insbesondere der Stickstoffgehalt optimiert werden, da die Nitrat-Variante einen deutlichen Einfluss auf das biochemische Profil (insbesondere der Erhöhung des Protein- und Linolsäuregehaltes) von *C. vulgaris* bewirkte. Ebenso sollten Makronährstoffe wie Phosphor untersucht werden, um weitere Einflussgrößen auf das Zellteilungsverhalten bzw. die biochemische Zusammensetzung zu charakterisieren und gegebenenfalls zu optimieren. Da gezeigt werden konnte, dass das Zellgewicht mit Zunahme der Photoperiode bzw. der Zellzahl stieg, ist von einer Einlagerung von Lipiden und Kohlenhydratspeichern, wie Stärke, auszugehen. Daher sollten in aufbauenden Versuchen der Gehalt dieser auch wirtschaftlich bedeutsamen Verbindungen überprüft werden.

Die Bedingungen für optimales Wachstum bzw. hohen Zellteilungsraten nicht (immer) deckungsgleich mit dem Optimum für die Produktion der hochwertigen Inhaltsstoffe. Daher sind z. B. mehrstufige Prozessabläufe (z. B. 1. Stufe: Wachstum, 2. Stufe: Induzierung gezielter Stoffwechselprozesse) zur Produktion der gewünschten Mikroalgen-

produkte zu untersuchen und die Erkenntnisse für einzelne Phasen mit einander zu koppeln. Molekularbiologische Untersuchungen können ebenfalls genutzt werden, um die Interaktion der Parameter im Zellstoffwechsel besser nachzuvollziehen und damit ein besseres Verständnis für die spezies-spezifischen Antworten der Mikroalgen auf die Veränderungen ihrer Umwelt zu erlangen (z. B. Bestimmung spezifischer Stressproteine). Nach Kula et al. (2014) können auch kalorimetrische Methoden verwendet werden, um die Stoffwechselaktivitäten der Zellen mit der Wärmefreisetzung gegenüberzustellen.

Die erreichten Ergebnisse stellen eine Basis für aufbauende Studien dar. Für die Mikrowellenbestrahlung konnte keine Reaktion in den Zellen auf Basis der Biomasserträge und untersuchten Inhaltstoffe nachgewiesen werden. Jedoch wiesen die Ergebnisse der UV-Versuche auf einen Effekt auf die biochemische Zusammensetzung wie z. B. die Fettsäurezusammensetzung hin. Jedoch konnten diese Ergebnisse durch die geringe Stichprobengröße nicht abgesichert werden. Die Parameterfenster zur Mikrowellen- und UV-Bestrahlung konnten somit eingeschränkt werden, da auch in der Literatur Hinweise zu möglichen (positiven) signifikanten Effekten gefunden wurden. Die entwickelten Systeme müssen jedoch im Bereich der Praktikabilität (insbes. Reinigung und Bruchfestigkeit der UV-Strahler) und der einstellbaren Parameter wie der Frequenz noch optimiert werden.

Durch die Nutzung der LED konnten zum einen verschiedene Stoffwechselaktivitäten wie z. B. die Erhöhung des Luteingehaltes, beeinflusst und zum anderen durch die Reduzierung des Stromverbrauches die Kosten bei der künstlichen Belichtung reduziert werden. Zudem stieg auch die Lichtnutzungseffizienz gegenüber der Nutzung von Leuchtstoffröhren. Da die Produktionskosten neben den zu geringen Erträgen der hochwertigen Inhaltsstoffe, nach Adarme-Vega et al. (2012) und Klinthong et al. (2015) bei der wirtschaftlichen Nutzung der Mikroalgen die Hauptbarriere darstellen, ist die Verwendung dieser Technologie weiter zu optimieren. Parallel dazu wiesen die Ergebnisse der Zellen aus den LED-Versuchen eine geringere Schwankungsbreite auf. Dies kann auch auf die Eigenschaften der Lichtemittierung (Leuchtdichte) und die spektrale Zusammensetzung zurückgeführt werden. Zudem weisen Leuchtstoffröhren einen elektrodenseitigen Leistungsabfall der Leuchtdichte auf und emittieren somit keine konstante Lichtintensität. Dies bietet auch die Möglichkeit, die Reproduzierbarkeit der Versuche zu erhöhen, die ein großes Problem bei der Durchführung von Untersuchungen mit Mikroalgen darstellt. Photobioreaktoren, wie z. B. „PhytoLux“ von der GMBU e.V. Halle, auf Basis eines Mehrplatzkultivierungssystem mit LED-Belichtung ermöglichen parallel verschiedene Lichtrezepte zu untersuchen, um die individuellen Reaktionsmuster der Mikroalgen zu identifizieren.

Neben den klassischen Charakterisierungsmethoden wurden moderne analytische Verfahren wie Rasterelektronenmikroskopie mit Elementanalyse sowie hochauflösende IR-Kameratechnik eingesetzt, um die ablaufenden Prozesse besser darstellen zu können. Die Ergebnisse sind vielversprechend hinsichtlich des dynamisch zeitaufgelösten Temperaturverlaufes und der Darstellung der Oberflächenstruktur. Jedoch muss die Präparationstechnik entscheidend verbessert werden, um weitere Aussagen mit diesen Methoden zu erhöhen.

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Strahlungsbereiche des elektromagnetischen Spektrums auf die Biomasseproduktion und Stoffwechselaktivität der Modellorganismen *C. vulgaris* und *S. obliquus* aus der Klasse der Grünalgen. Für die Versuche wurde jeweils ein separates Photobioreaktorsystem auf Basis von Blasensäulenreaktoren verwendet. Untersucht wurden die Wachstumsprofile an Hand der Zellzahl und Wachstumsraten, der Biomassertrag, sowie die Bestimmung folgender Inhaltsstoffe: Gesamtproteingehalt, Fettsäuregehalt von Linol- und α -Linolensäure, der Carotinoidgehalt von β -Carotin, Lutein und Astaxanthin sowie von Chlorophyll a und b. Die Bestimmung der biochemischen Parameter erfolgte aus gefriergetrockneten Proben am Versuchsende. Die Bestimmung von Chlorophyll und des Gesamtcarotinoidgehaltes erfolgte versuchsbegleitend aus methanolischen Extrakten.

Der Einfluss verschiedener Photoperioden wurde durch die Variation der Belichtungsdauern zwischen 14 h und 24 h untersucht. Das Ergebnis war ein Anstieg des Biomassertrages mit der Zunahme der Belichtungsdauer. So stieg dieser im Vergleich zur kürzesten Photoperiode um das 1,9-fache bei *C. vulgaris* und um das 1,6-fache bei *S. obliquus* unter Dauerbelichtung. Das biochemische Profil veränderte sich ebenfalls mit der Photoperiodendauer. Zur Bewertung der Umsetzung der eingesetzten Lichtenergie in die Produktion der untersuchten Stoffwechselfparameter wurde das Gesamtlichtintegral auf den Biomassertrag und den Gehalt der Inhaltsstoffe ermittelt. Die höchste effiziente Lichtnutzung zur Biomassebildung ergab sich somit für *C. vulgaris* bei einer Photoperiode von 20 h und für *S. obliquus* mit 16 h. Längere Belichtungsdauern führten nicht zu einer optimierten Nutzung der Lichtenergie zum Aufbau von Biomasse. Für die analysierten Inhaltsstoffe am Versuchsende ergab sich ebenfalls, dass die Lichtnutzungseffizienz mit der Zunahme der Photoperiodendauer für den volumetrischen Ertrag, mit Ausnahme für Linolsäure, tendenziell sinkt. Somit war für *C. vulgaris* die Lichtnutzungseffizienz bezogen auf den volumetrischen Gehalt für alle bestimmten Stoffwechselprodukte, mit Ausnahme von Linolsäure, bei den Kulturen mit einem Tag-Nacht-Regime von 14:10-h am höchsten. Für *S. obliquus* ergab sich für die Protein- und Luteinbildung die höchste Effizienz ebenfalls mit einem Tag-Nacht-Regime von 14:10-h, während die Fettsäuren am effektivsten bei 20:4-h und β -Carotin und Astaxanthin bei 16:8-h gebildet wurden.

In beiden Spezies sank der Chlorophyllgehalt mit der Dauer der Photoperiode. Dies deutet auf eine Nährstofflimitierung hin, wodurch N-haltige Verbindungen wie Proteine und Chlorophyll abgebaut werden und vermehrt Reservestoffe wie Lipide eingelagert werden. Diese Lipideinlagerung konnte durch die Gelbfärbung der Kulturen, die mit einer Photoperiode von ≥ 20 h kultiviert wurden, bestätigt werden. Aktuell wird die N-Limitierung auch als Strategie zur „Verfettung“ der Biomasse intensiv untersucht, um z. B. Biodiesel auf der Mikroalgenbiomasse zu gewinnen. Somit ist dies auch prinzipiell für *C. vulgaris* und *S. obliquus* anwendbar.

In Bezug auf die Beurteilung als Produktionsorganismus und in Abhängigkeit von der untersuchten Photoperiode ist *S. obliquus* durch höhere volumetrische Erträge für eine Biomasse mit hohem α -Linolensäuregehalt (25–96 %) geeignet, während die Biomasse von *C. vulgaris* höhere Anteile von Linolsäure (70–120 %) und Astaxanthin (20–110 %) aufwies.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde eine LED-Belichtung (49:26:25 RGB) mit einem Tag-Nacht-Regime von 20:4-h bei *C. vulgaris* getestet und mit den Ergebnissen der 20:4-h Belichtung mit Leuchtstoffröhren verglichen. Dabei konnte durch die LED-Belichtung ein 18 % höherer Biomassertrag erreicht und somit die Lichtnutzungseffizienz für die Biomasseproduktion gesteigert werden. Die Zellzahl stieg ebenfalls im Mittel um 12 %. Zwar sanken die Zellgehalte von Protein (-13 %), β -Carotin (-15 %), Linolsäure (-7 %) sowie von Chl a (-25 %) und Chl b (-33 %), aber durch die höheren Zellzahlen bei längerer Belichtung konnten vergleichbare volumetrische Erträge erreicht werden. Durch den geringeren Energieverbrauch wirkte sich dies positiv auf die Lichtnutzungseffizienz aus. Die untersuchte spektrale Zusammensetzung der LED bewirkte zudem eine erhöhte Konzentration von α -Linolensäure (66 %), Astaxanthin (26 %) und Lutein (9 %). Die geringere Chlorophyllkonzentration bei gleichzeitig höheren Biomasserträgen und Zellkonzentrationen beweist die Anpassung und effizientere Nutzung der ankommenden Photonen auf den Stoffwechsel von *C. vulgaris*. Die Nutzung der LED-Belichtung stellt somit eine Optimierung der Prozessführung unter künstlicher Belichtung dar, bei der auch das biochemische Profil manipuliert werden kann. Nach Chen et al. (2011) können 50 % der Energiekosten für die Belichtung reduziert werden.

Auf Grund der Feststellung der Nitrat- bzw. N-Limitierung mit zunehmender Zellzahl wurde im Rahmen eines Nitrat-Versuches der Stickstoffeinfluss in *C. vulgaris*-Zellen untersucht. Diese Untersuchung erfolgte im Vergleich zur Dauerbelichtung mit dem Standardmedium auf Grund der stärksten Stickstofflimitierung. Zwar konnte trotz erhöhter Chlorophyll- und Proteinkonzentration den Zellen der Nitrat-Variante keine Veränderung in Bezug auf den Biomassertrag erreicht werden, jedoch stieg auch der Linolsäuregehalt in den Zellen um 66 %, während der α -Linolensäuregehalt unverändert blieb. Dies deutet auf eine stickstoffinduzierte Anreicherung durch z. B. Veränderung der Enzymaktivitäten hin. Da mit zunehmender Sättigung der Fettsäuren die Stabilität gegenüber Oxidationsprozessen erhöht wird, kann dieser Effekt eine Optimierung der Nutzung der Algenbiomasse zur Produktion von Biodiesel darstellen. Die Stickstoffverfügbarkeit als Werkzeug zur Manipulation der biochemischen Zusammensetzung konnte somit dargestellt werden. Dies muss in Untersuchungen bei geringeren Belichtungsdauern und mit der LED-Technik weiter untersucht werden, um die Prozessführung weiter zu optimieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an *C. vulgaris*-Zellen mit zusätzlich CO₂-angereicherter Luft (0,75 %) konnten zudem zeigen, dass dieser Faktor, neben Stickstoff, einen entscheidenden Faktor für das Wachstum, das biochemische Profil und die Kultivierungsbedingungen darstellt. Der Biomassertrag stieg hierbei signifikant in den Kulturen um +230 %. Auf Grund des zu starken Wachstums wurde dies jedoch nicht verfolgt, um sensible Effekte der Behandlung mit elektromagnetischer Strahlung besser detektieren zu können.

Zur Untersuchung des Einflusses von Mikrowellen- und UV-Strahlung wurde im Rahmen der bearbeiteten Forschungsprojekte eine Mikrowellenbehandlungsanlage (2,45 GHz, 200–1200 W) und eine UV-A (370 nm) und UV-B-Bestrahlungseinheit (312 nm) entwickelt. Die Untersuchungen erfolgten bei einem Tag-Nacht-Regime von 14:10-h. Durch den Einsatz der Mikrowellentechnik konnte kein Einfluss auf das Wachstumsprofil und die biochemische Zusammensetzung nachgewiesen werden. An Hand der Literaturoauswertung konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mikrowellenbehandlung im nicht thermischen Bereich ein möglicher Ansatzpunkt für eine schonende Behandlung zur Induzierung von Stoffwechselprozessen darstellt. Stärkere Effekte könnten bei höheren Frequenzen im EHF-Bereich auftreten.

Eine wiederholte UV-A und UV-B Bestrahlung deutet dagegen eine Reduzierung der Zellzahl und somit einen Einfluss auf den Reproduktionsprozess an. Weitere Veränderungen auf das biochemische Profil, wie z. B. eine Erhöhung von Astaxanthin und α -Linolensäure, müssen in weiteren Studien detailliert untersucht werden.

In bisherigen Studien wurde häufig die Auswertung der Lichtnutzungseffizienz vernachlässigt und lediglich die Lichtintensität und Leistungszahl der verwendeten Lichtquellen veröffentlicht. Die Angaben zur Intensität des Lichtes sind jedoch nicht ausreichend, da keine Informationen enthalten sind, welche Photonen emittiert werden und somit welche Energie von den Pigmenten der Algenzellen absorbiert wird. Durch Ermittlung des Gesamtlichtintegrals kann ein Indikator für die Lichtnutzungseffizienz ermittelt werden. Dies stellt eine Möglichkeit dar, Intensität und Energieverbrauch für die Produktion des Zellproduktes bezogen auf die Lichtenergie bei unterschiedlicher Behandlung zu vergleichen und zu bewerten. Dadurch kann auch die spektrale Zusammensetzung optimiert werden.

Moderne analytische Methoden wie REM mit EDX-Elementaranalyse sowie hochaufgelöste schnelle Infrarotthermographie wurden zur weiteren Untersuchung der Bestrahlungseffekte angewendet. Dadurch konnte die Oberflächenstruktur der Algen und das dynamische, zeitaufgelöste Temperaturverhalten durch die Bestrahlung dargestellt werden.

Die Versuche und die Auswertung der Literatur haben gezeigt, dass kein speziesübergreifendes definiertes "Optimum" bestimmt werden kann, da die artenspezifische, Anpassungsfähigkeit (u. a. genetische Anlagen, „Lichthistorie“, zirkadiane Rhythmus, Herkunft der Kultur) an verändernde Bedingungen stark variiert (Cuhel et al. 1984, Edmundson und Huesemann 2015). Diese Wechselwirkungen sind sehr komplex und zeitabhängig. Die Kultivierungsbedingungen müssen an die individuellen Ansprüche der Spezies, aber auch das Zielprodukt angepasst werden.

Summary

The goal of this work was to investigate the influence of different electromagnetic radiation onto the biomass production and metabolic activity of the green algae model organism *C. vulgaris* and *S. obliquus*. A separate photo-bioreactor system based on a bubble column reactor was built for the cultivation of non-axenic cultures. The growth profiles were studied by the cell counts and growth rates, the biomass production as well as the determination of the following ingredients: total protein content, fatty acid content of linoleic and α -linolenic acid, carotenoid content of β -carotene, lutein and astaxanthin as well as chlorophyll a and b of the freeze-dried samples at the end of the experiments. The chlorophyll content and total carotenoid content were monitored during the test according to methanol extractions.

Different day-night-cycles between 14:10-h and 24:0-h were studied to determine its influence. Long exposure times lead to an increase in biomass production by a factor of 1.9 and 1.6 for *C. vulgaris* and *S. obliquus*, respectively. With regard to an efficient light usage and biomass production, the best day-night cycle was 20:4 h for *C. vulgaris* and 16:8 h for *S. obliquus*.

The biochemical profile was dependent on the photoperiod and to changes in the culture medium during the tests. To evaluate the light conversion into the production of metabolic products, the total light integral in relation to the biomass production and the content of the various ingredients were investigated. These effects were species-dependent and show the individual response of the algae on environmental changes. However, long photoperiods correlate with low light usage efficiencies. If this efficiency is considered as well, the 14:10 h period is the most effective for *C. vulgaris* (except for linoleic acid). For *S. obliquus*, the highest efficiency for proteins and lutein was for 14:10-h, for fatty acids 20:4 h and for β -carotene and astaxanthin 16:8 h. For both species, the chlorophyll content was decreasing with illumination time.

Due to a limitation of nutrients (nitrate resp. N), chlorophyll and proteins are degenerated and metabolism of the algae is directed to reserve storage components of carbohydrates or lipids. The incorporation of lipids was proven by the yellow coloring of the cultures under long photoperiods (≥ 20 h). Currently, the effect of nitrate limitation for the fatty degeneration of bio mass is studied intensively and should be possible with both cultures. This effect can be applied for the production of biodiesel by algae.

In relation to the assessment of the cultures as biomass production organism under the different cultivation conditions, it can be said that *S. obliquus* had higher volumetric yield for α -linolenic acid (25–96 %) and the biomass of *C. vulgaris* had higher yields of linoleic acid (70–120 %) and astaxanthin (20–110 %).

Based on the experiments, LED lighting (49:26:25 RGB) for 20:4-h was tested on *C. vulgaris* and compared to fluorescent lighting 20:4-h day-night regime. Due to the LED, the light usage efficiency was raised, the average biomass production was increased by 18 % and the average cell concentration increased by 12 %. However, the cell content of proteins (-13 %), β -carotene (-15 %), linoleic acid (-7 %), chl a (-25 %) and b (-33 %) decreased but were partly compensated by the higher cell concentration. The light use

efficiency improved due to the low power consumption of the LEDs. Otherwise, the spectral composition of the LED light leads to an increase in α -linolenic acid (66 %), astaxanthin (26 %) and lutein (9 %). The low chlorophyll content and at the same time high bio mass production and cell numbers proved the assumption that the metabolism of the algae adapted well on the LED and used the photons efficiently. Hence, LED technology is a key factor to manipulate the biochemical profile of the algae and to optimize the reactor processes with artificial lighting. According to Chen et al. (2011) 50 % of the electricity consumption could be reduced by using LED light source instead of fluorescent lamps at the same total light intensity.

Due to the effect of nitrate limitation caused by increased cell numbers, an experiment with an excess of nitrates was done with *C. vulgaris* cells. Here, the experiment was done under continuous light because of the fast cell growth. No change in biomass production was observed despite higher chlorophyll and protein concentrations. The linoleic acid concentration increased by 77 % (relative) resp. 66 % (absolute) in contrast to unchanged α -linolenic acid content. It indicates a nitrate-induced accumulation by increased enzyme activities. This can be used for algae-based biodiesel, because of beneficial properties of saturated fatty acids against oxidation processes. Again, the nitrate concentration can be used to manipulate the biochemical composition in the PBR. Further research is needed to investigate the influence of the LEDs with shorter photoperiods and higher nitrate concentration to optimize the microalgal biomass resp. the production of high value components.

Experiments with CO₂ enriched air (0.75 %) showed a beneficial effect on cell growth and cultivation conditions in *C. vulgaris*. The biomass yield increased significantly by 230 %. Due to the extreme growth, no detailed analysis on the dependencies on the other parameters was done to detect small effects of tested treatments.

In the framework of the research projects, a microwave treatment system (2.45 GHz, 200–1000 W) was developed as well as a radiation unit for UV-A (at 370 nm) and UV-B (at 312 nm) at 14:10-h day-night-regime. The microwave treatment induced no changes of the cell proliferation and biomass production. It is known from literature that a microwave treatment in the non-thermal range could induce gently beneficial metabolic processes. Stronger effects can occur at higher frequencies at EHF-range and lower power. However, first experiments with repeated UV-A and UV-B influence indicate a reduction in cell number and hence an influence onto the proliferation mechanisms. Further extended studies have to validate this preliminary finding like the dependency on increased astaxanthin and α -linolenic acid content.

In general, the analysis of the light use efficiency was not considered in recent studies. Mainly the light intensity and the energy efficient ratio of the light sources were investigated. This data are not sufficient because it is unclear which light spectrum (photons) was used for lighting. It is well known that the absorption of light by the plant pigments is wavelength-dependent. An indicator of the light use efficiency is the total light integral. It gives the possibility to compare different treatments because it depends on the intensity and the energy consumption used for the biomass production.

Modern, high-resolution methods like SEM with EDX-analysis as well as fast IR-thermography were used for the evaluation of the radiation effects. The surface structure of the algae and the dynamic, time-resolved temperature behavior caused by the illumination was shown.

The experiments and literature research showed that there is no optimum for all species because of the high variability of the species-specific adaptability (e.g. genetic factors, circadian rhythm, light history and origin of the cultures) (Cuhel et al. 1984, Edmundson und Huesemann 2015). These interactions are complex and time-dependent. Experiments with different cultures are relevant to understand the algae response to changing environmental factors. The cultivation parameters have to be adapted to the species and to the wanted microalgal product. Probably, individual light recipes have to be prepared to optimize the light usage for each species. The availability of nutrients is a further essential factor which influences the biochemical profile the individual species.

Literaturverzeichnis

- Abu-Ghosh S., Fixler D., Dubinsky Z., Solovchenko A., Zigman M., Yehoshua Y. und Iluz D. 2015. Flashing light enhancement of photosynthesis and growth occurs when photochemistry and photoprotection are balanced in *Dunaliella salina*. *Eur. J. Phycol.* 50(4): 1–12. doi.org/10.1080/09670262.2015.1069404
- Adarme-Vega T., Lim D.K.Y., Timmins M., Vernen F., Li Y. und Schenk P.M. 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb. Cell Fact.* 11(96): 1–10. doi.org/10.1186/1475-2859-11-96
- Anhäuser M., Arnheim K., Becker-Follmann J., Bense J., Bergfeld R., Berthold P., Bogenrieder A., Bohrmann J. Bonk M. Born, J. und v.m. 1999. Lexikon der Biologie- Photosynthese. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag. Online verfügbar 25.6.17 www.spektrum.de/lexikon/biologie/photosynthese/51369
- Arnold W. 2013. Projektbesprechung, persönliche Notizen. 17.2.2014
- Balasubramanian S., Allen J.D., Kanitkar A. und Boldor D. 2011. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system-design, optimization, and quality characterization. *Bioresour. Technol.* 102(3): 3396–3403. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.119
- Banik S., Bandyopadhyay S. und Ganguly S. 2003. Bioeffects of microwave-a brief review. *Bioresour. Technol.* 87(2): 155–159. doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00169-4
- Barra L., Chandrasekaran R., Corato F. und Brunet C. 2014. The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Mar. Drugs.* 12(3): 1641–1675. doi.org/10.3390/md12031641
- Béchet Q., Shilton A. und Guieysse B. 2013. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol. Adv.* 31(8): 1648–1663. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014
- Becker E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1.Auflage.
- Becker E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* 25(2): 207–210. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
- Behrens P.W., Bingham S.E., Hoeksema S.D., Cohoon D.L. und Cox J.C. 1989. Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 1(2): 123–130. doi.org/10.1007/BF00003874
- Behrens P.W. 2005. Photobioreactors and fermenters: The light and dark sides of growing algae. In: *Algal Culturing Techniques* (Hrsg. Andersen R.A.). Oxford: Elsevier Academic Press. Großbritannien, 1. Auflage: 189–204.
- Bell G. 2012. Experimental evolution of heterotrophy in a green alga. *Evolution.* 67(2): 468–476. doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01782.x

- Belotti, G., Bravi, M., Caprariis, B., Filippis, P. and Scarsella, M. 2013. Effect of Nitrogen and Phosphorus Starvations on *Chlorella vulgaris* Lipids Productivity and Quality under Different Trophic Regimens for Biodiesel Production. *Am. J. Plant. Sci.* 4(12B): 44–51. doi.org/10.4236/ajps.2013.412a2006
- Benavente-Valdés J.R., Aguilara C., Contreras-Esquivela J.C., Méndez-Zavala A. und Montañez. 2016. J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnol Rep (Amst)*. 10: 117–125. doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001
- Benemann J. 2007. Hydrogen and methan production by microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Hrsg. Richmond A.). Oxford: Blackwell publishing, Großbritannien, 4. Auflage: 403–416.
- Berner T., Dubinsky, Z., Wyman K. und Falkowski P.G. 1989. Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 25(1): 70–78. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x
- Betskii O.V., Lebedeva N.N., Tambiev A.H., Kirikova N.N und Slavin V.E. 2007. Millimeter waves in the newest agricultural biotechnologies. *HIT Journal of Science and Engineering B*. 23(4): 236–252.
- Blanken W., Cuaresma M., Wijffels R.H. and Janssen M. 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res.* 2(4): 333–340. doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004
- Blumreisinger M., Meindl D. und Loss D. 1983. Cell wall composition of chlorococcal alga. *Phytochemistry*. 22(7): 1603–1604.
- Boelen P., Dijk R. van, Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C und Buma A.G.J. 2013. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express*. 3(26): 1–9. doi.org/10.1186/2191-0855-3-26
- Bohne F. und Linden H. 2002. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1579(1): 26–34. doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00500-6
- Bosma R. 2010. Towards high productivities of microalgae in photobioreactors. Dissertation, University Wageningen, Wageningen/Niederlande
- Bouterfas R., Belkoura M. und Dauta A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rates of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica* 25(3): 647–656.
- Carvalho A.P., Meireles L.A. und Malcata F.X. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22(6): 1490–1506. doi.org/10.1021/bp060065r
- Carvalho A.P., Silva S.O., Baptista J.M. und Malcata F.X. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(5): 1275–1288. doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8
- Cazzonelli C.I. 2011. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* 38(11): 833–847. doi.org/10.1071/FP11192
- Ceatteau P. 1996. Micro-Algae. In: *Manual in the production and use of live food for aquaculture* (Hrsg. Lavens P. und Sorgeloos P.). Rom: Fisheries Technical Paper. No. 361, Italien: 7–48.

- Çelekli A., Balcı M. und Bozkurt H. 2008. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresour. Technol.* 99(18): 8742–8747. doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.028
- Chen C.-Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.-J. und Chang, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* 102: 71–81. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chmiel H. 2006. *Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. München: Spektrum -Akademischer Verlag, Deutschland.
- Chrismadha T. und Borowitzka M.A. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6(1): 67–74. doi.org/10.1007/BF02185906
- Croce R. und Amerongen H. van. 2013. Light-harvesting in photosystem I. *Photosyn. Res.* 116(2-3): 153-166. doi.org/10.1007/s11120-013-9838-x
- Cuhel R.L., Ortner P.B. und Lean D.R.S. 1984. Night synthesis of protein by algae. *Limnol. Oceanogr.* 29(4): 731–744. doi.org/10.4319/lo.1984.29.4.0731
- D'Alessandro E.B und Filho N.R.H. 2016. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 58: 832–841. doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162
- Das P., Lei W., Aziz S.S. und Obbard J.P. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour. Technol.* 102(4): 3883–3887. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102
- Das U.N. 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol. J.* 1(4): 420–439. doi.org/10.1002/biot.200600012
- Del Campo J.A., García-González M. und Guerrero. M.G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(6): 1163–1174. doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9
- Ecke M. 2004 a. 2,5 Milliarden Jahre Erfahrung der Natur -Mikroalgen als alternative Roh- und Wirkstoffquelle. In: *Produktvielfalt durch Ressourcenvielfalt-Potenziale genetischer Ressourcen* (Hrsg. Begemann F. und Schröder S.). Bonn: Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI), Informationszentrum Biologische Vielfalt (IBV), Deutschland: 140–148.
- Ecke M. 2005. Mikroalgen der Spezies *Chlorella vulgaris* - ein Naturprodukt mit in Europa bisher unbeachtetem pharmazeutischen Potential. *Bioprodukte Prof. Steinberg GmbH*.
- Edmundson S. J und Huesemann M.H. 2015. The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Res.* 12: 470–476. doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012

- Ellenberg H. und Leuschner C. 2010. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen: in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht. Stuttgart: UTB Verlag, 6. Auflage.
- Erwin. J.A. 1973. Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms. London: Academic Press, Inc., 1. Auflage.
- Ettl H., Gerloff, J., Heying H. und Mollenhauer D. 1983. Chlorophyta I: Phytomonadina). In: Süßwasserflora von Mitteleuropa (Hrsg. Büdel, B. Gärtner, G. Krienitz L., Preisig H.-R. und Schagerl M.). Jena: VEB Gustav Fischer Verlag Jena, Deutschland, 1. Auflage, Band 9.
- Fábregas J., Domínguez A., García-Álvarez D., Lamela T. und Otero A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. Biotechnol. Lett. 20(6): 623–626.
doi.org/10.1023/A:1005322416796
- FAO. 2012. Aquatic biofuels - open ponds. online verfügbar am 22.12.2012: www.fao.org/bioenergy/aquaticbiofuels/knowledge/open-ponds/en
- Feng D., Chen Z., Xue S. und Zhang W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. Bioresour. Technol. 102(12): 6710–6716.
doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.006
- Fernandes T, Fernandes I., Andrade C.A.P und Cordeiro N. 2016. Changes in fatty acid biosynthesis in marine microalgae as a response to medium nutrient availability. Algal Res. 18: 314–320. doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.005
- Fogg G.E. 2001. Algal adaptation to stress-some general remarks. In: Algal Adaptation to Environmental Stresses (Hrsg. Rai L.C. und Gaur J.P.). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, Deutschland, 1. Auflage: 1–20.
- Frank H. und Cogdell R.J. 1996. Carotenoids in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 63(3): 257–264. doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022
- Friedl T. 1995. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae - a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl-Nov). J. Phycol. 31(4): 632–639.
doi.org/10.1111/j.1529-8817.1995.tb02559.x
- Fu W., Guðmundsson O., Paglia G., Herjólfsson G., O.S. Andrésson, Palsson B. Ø. und Brynjólfsson S. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97(6): 2395–2403.
doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5
- García-Camacho F., Sanchez-Miro A., Molina-Grima E., Camacho-Rubio F. und Merchuck J.C. 2012. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. J. Theor. Biol. 304(7): 1–15.
doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.03.021

- Griffiths M.J., Dicks R.G, Richardson C. und Harrison S.T.L. 2011a. Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel. In: Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies (Hrsg. Stoytcheva M). Intech. Kapitel 9: 177–200. doi.org/10.5772/30085
- Griffiths M.J., Garcin C., Hille R.P. und Harrison S.T.L. 2011b. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. J. Microbiol. Methods. 85(2): 119–123. doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005
- Grobbelaar J. U., Kroon B. M. A., Burgerwiersma T., Mur L. R. 1992. Influence of medium frequency light dark cycles of equal duration on the photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa*. Hydrobiologia 238(1): 53–62. doi.org/10.1007/BF00048773
- Grobbelaar J.U., Nedbal L. und Tichy V. 1996. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. J. Appl. Phycol. 8(4–5): 335–343. doi.org/10.1007/bf02178576
- Grobbelaar J.U. 2007. Algal nutrition. Mineral Nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology (Hrsg. Richmond A.). Oxford: Blackwell Publishing, 4. Auflage: 97–115.
- Gromozova E.N., Voychuk S.I., Zelena L.B und Gretskey. 2011. Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation. Safety Engineering. 2(3): 89–92. doi.org/10.7562/SE2012.2.02.06
- Grundler W., Keilmann F. und Fröhlich H. 1977. Resonant growth rate response of yeast cells irradiated by weak microwaves. Phys. Lett. A. 62(6): 463–466. doi.org/10.1016/0375-9601(77)90696-X
- Guckert, J.B. und Cooksey, K.E. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH induced cell cycle inhibition. J. Phycol. 26(1): 72–79. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x
- Gude V.G., Patil P., Martinez-Guerra E., Deng S.und Nirmalakhandan N. 2013. Microwave energy potential for biodiesel production. Sustainable Chemical Processes. 1(5): 1–31. doi.org/10.1186/2043-7129-1-5
- Guedes A.C., Amaro H.M. und Malcata F.X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. Mar. Drugs. 9(4): 625–644. doi.org/10.3390/md9040625
- Guiry. M.D. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Online verfügbar am 31.5.2017. www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676
- Guiry. M.D. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Online verfügbar am 31.5.2017. www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27885

- Häder D.-P. 2000. Effekte erhöhter UV-Strahlung auf Primärproduzenten. In: Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie: Band 3A - Aquatische Systeme: Grundlagen - Physikalische Belastungsfaktoren - Anorganische Stoffeinträge (Hrsg. Guderian R. und Gunkel G.). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, Deutschland, 1. Auflage: 230–242.
- Häder D.-P., Helbing E.W., Williamson C.E. und Worrest R.C. 2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interaction with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10(2): 242–260. doi.org/10.1039/C0PP90036B
- Hammed A.M., Prajapati S.K., Simsek S. und Simsek H. 2016. Growth regime and environmental remediation of microalgae. *ALGAE.* 31(3): 189–204. doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.28
- Hammer G. 2012. Untersuchung der Hochfrequenzeigenschaften von Grünalgen. Präsentation im Rahmen der Projektbesprechung, Backnang-Waldrems, 25.02.2012
- Han D., Li Y. und Hu Q. 2013. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *ALGAE.* 28(2): 131–147. doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.131
- He Y.Y. und Häder D.-P. 2002. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-l-cysteine. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 66(2): 115–124. doi.org/10.1016/S1011-1344(02)00231-2
- Hideg E., Jansen M.A.K. und Strid A. 2002. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18(2): 107–115. doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003
- Ho S.H., Chen C.Y. und Chang J.S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW–N. *Bioresour. Technol.* 113: 244–252. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Hodaifa G., Martinez M. E. und Sanchez S. 2008. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 99(5): 1111–1117. doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.020
- Hodaifa G., Martinez M. E. und Sanchez S. 2009a. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84(10): 1550–1558. doi.org/10.1002/jctb.2219
- Hodaifa G., Martinez M. E. und Sanchez S. 2009b. Influence of pH on the Culture of *Scenedesmus obliquus* in Olive-mill Wastewater. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 14(6): 854–860. doi.org/10.1007/s12257-009-0119-7
- Höpfner M. 2014. Abschlussbericht zum ZIM-Kooperationsprojekt: Nutzung einer Mikrowellenmodifikation an Algen für neue Applikationsfelder; Zeitaufgelöste Infrarot-Messbox für Mikrowellenbehandlung von Algensystemen (FKZ: KF2440904MD)

- Hu H. und Gao K. 2006. Response of growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.* 28(13): 987–992. doi.org/10.1007/s10529-006-9026-6
- Hu Q. 2007. Environmental effects on cell composition. In: *Handbook of Microalgal Culture* (Hrsg. Richmond A.). Oxford: Blackwell Publishing, Großbritannien, 4. Auflage: 83–115.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. und Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal.* 54(4): 621–639. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Hüber Y. 2014. Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Belichtungszyklen auf das Wachstumsverhalten von Mikroalgen zur Steigerung der Biomasse, sowie des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes am Beispiel von *Scenedesmus obliquus*. Masterarbeit, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Fakultät Landbau/Umwelt/Chemie, Dresden
- Huerlimann R., Nys R.de und Heimann K. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* 107(2): 245–257. doi.org/10.1002/bit.22809
- Huerlimann R., Steinig E.J., Loxton H., Zenger K.R., Jerry D.R. und Heimann K. 2014. Effects of growth phase and nitrogen starvation on expression of fatty acid desaturases and fatty acid composition of *Isochrysis aff. galbana* (TISO). *Gene.* 545(1): 36–44. doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.009
- Hunt R.W., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S. und Das K.C. 2009. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *Int. J. Mol. Sci.* 10(10): 4515–4558. doi.org/10.3390/ijms10104515
- Ibanez E. und Cifuentes A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *J. Sci. Food Agric.* 93(4): 703–709. doi.org/10.1002/jsfa.6023
- Iwamoto H. 2007. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species *Chlorella*. In: *Handbook of Microalgal Culture* (Hrsg. Richmond A.). Oxford: Blackwell Publishing, Großbritannien, 4. Auflage: 255–263.
- Jahns P. und Holzwarth A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817(1): 182–193. doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.012
- Janković S.M., Milošev M.Z. und Novaković M.L.J. 2014. The effects of microwave radiation on microbial cultures, *Hospital Pharmacology.* 1(2): 102–108. doi.org/10.5937/hpimj1402102J
- Jansen M.A.K., Van Den R. und Noort E. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3(4): 131–135. doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01215-1

- Jesus Raposo M.F.de., Morais R.M.S.C.de und Morais A.M.M.B de. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 93(15): 479–486. doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002
- Johnson E. A. und An, G.-H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev Biotechnol.* 11(4): 297–326. doi.org/10.3109/07388559109040622
- Johnson E. A. und Schroeder W. A. 1996. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 53:119–178.
- Juneja A., Ceballos R.M. und Murthy G.S. 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies.* 6(9): 4607–4638. doi.org/10.3390/en6094607
- Kaye Y., Grundman O., Leu S., Zarka A., Zorin B., Didi-Cohen S., Khozin-Goldberg I. und Boussiba S. 2015. Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous $\Delta 12$ desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG. *Algal Res.* 11: 387–398. doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.003
- Khoeyi Z.A., Seyfabadi J. and Ramezanpour Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquac Int.* 20(1): 41–49. doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1
- Kim D.G., Lee C., Park S.-M., und Choi Y.E. 2014. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 159: 240–248. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078
- Klinthong W., Yang Y.-H., Huang C.-H. und Tan C.-S. 2015. A Review: Microalgae and Their Applications in CO₂ Capture and Renewable Energy. *Aerosol Air Qual. Res.* 15(2): 712–742. doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299
- Koberg M., Cohen M., Ben-Amotz A. und Gedanken A. 2011. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresour. Technol.* 102(5): 4265–4269. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.004
- Kolber Z., Zehr J. und Falkowski P. 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem I. *Plant Physiol.* 88(3): 923–929. doi.org/10.1104/pp.88.3.923
- Kondo N. und Kawashima M. 2000. Enhancement of Tolerance to Oxidative Stress in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seedlings by UV-B irradiation: Possible Involvement of Phenolic Compounds and Antioxidative Enzymes. *J. Plant Res.* 113(3): 311–317. doi.org/10.1007/PL00013863
- Kula M., Rys M., Mozdzen K. und Skoczowski A. 2014. Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. *Eng. Life Sci.* 14(1): 57–67. doi.org/10.1002/elsc.201200184

- Lang I., Hodac L., Friedl T. und Feussner I. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*. 11 (124): 1–16.
doi.org/10.1186/1471-2229-11-124
- Lee C.-G. und Palsson B.O. 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to Red Light from Light Emitting Diodes Leads to Autospore Release Following Each Cellular Division. *Biotechnol. Prog.* 12(2): 249–256. doi.org/10.1021/bp950084t
- Lee Y.-K. und Shen H. 2007. Basic Culturing Techniques. In: *Handbook of Microalgal Culture* (Hrsg. Richmond A.). Oxford: Blackwell Publishing, Großbritannien, 4. Auflage: 40–56.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. and Oh, H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* 101(1): 575–577. doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058
- Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N. und Lan C.Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81(4): 629–636. doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1
- Liang Y., Sarkany N. und Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions *Biotechnol. Lett.* 31(7): 1043–1049. doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7
- Lichtenthaler H.K. und Buschmann C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8. doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01
- Linne von Berg K.-H., Hoef-Emden K., Marin. B und Melkonian M. 2004. *Der Kosmos-Algenführer*. Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlag, Deutschland.
- Liu J. und Hu Q. 2013. *Chlorella*: Industrial production of cell mass and chemicals. In: *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology* (Hrsg. Richmond A. und Hu Q.) Oxford: Wiley-Blackwell, 2. Auflage: 329–338.
- Lorenz M., Friedl. T und Day J.G. 2005. Perpetual Maintenance of Actively Metabolizing Microalgal Cultures. In: *Algal Culturing Techniques* (Hrsg. Andersen R.A.). Oxford: Elsevier Academic Press, Großbritannien, 1. Auflage: 145–156.
- Lower S.K. 1996. Carbonate equilibria in natural waters. *Chem. Environmental Chemistry*. Simon Fraser University Burnaby, Kanada.
- Luo H.P. und Al-Dahhan M.H. 2004. Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 85(4): 382–393. doi.org/10.1002/bit.10831
- Lürling M. 1998. Effect of grazing-associated infochemicals on growth and morphological development in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 34(4): 578–586. doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340578.x
- MacIntyre H.L. und Cullen J.J. 2005. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. In: *Algal Culturing Techniques* (Hrsg. Andersen R.A.). Oxford: Elsevier Academic Press, 1. Auflage: 287–326.

- Mallick N. und Mohn F.H. 2000. Reactive oxygen species: response of alga cells. *J Plant Physiol.* 157(2): 183–193. doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Mandal S. und Mallik N. 2009. Microalgae *Scenedesmus obliquus* as potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(2): 281–291. doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6
- Mandalam R.K und Palsson B. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 59(5): 605–611. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<605::AID-BIT11>3.0.CO;2-8
- Martínez F. und Orús M.I. 1991. Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 101. *Plant Physiol.* 95(4): 1150–1155. doi.org/10.1104/pp.95.4.1150
- Mata T.M., Melo A.C., Simoes M. und Caetano N.S. 2012. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 107: 151–158. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109
- Mata T.M., Melo A.C., Meireles S., Mendes A.M., Martins A.A. und Caetano N.S. 2013. Potential of microalgae *Scenedesmus obliquus* grown in brewery wastewater for biodiesel production. *Chem. Eng. Trans.* 32: 901–906. doi.org/10.3303/cet1332151
- Matsuo T. und Ishiura, M. 2010. New Insights into the Circadian Clock in *Chlamydomonas*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 280: 281–314. doi.org/10.1016/S1937-6448(10)80006-1
- Mercer P. und Armenta R.E. 2011. Developments in oil extraction from microalgae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113(5): 539–547. doi.org/10.1002/ejlt.201000455
- Miller D.H., Lamport D.T.A. und Miller M. 1972. Hydroxyproline Heterooligosaccharides in *Chlamydomonas*. *Science.* 176 (4037): 918–920. doi.org/10.1126/science.176.4037.918
- Miller D.H., Seth Mellman I., Lamport D.T.A. und Miller M. 1974. The chemical composition of the cell wall of *Chlamydomonas gymnogama* and the concept of a plant cell wall protein. *J. Cell Biol.* 63(2): 420–429.
- Mohsenpour S.F., Richards B. und Willoughby N. 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour. Technol.* 125: 75–81. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.072
- Mohsenpour S.F. und Willoughby N. 2013. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresour. Technol.* 142: 147–153. doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.024
- Morais M.G. de, Vaz B.d.S, de Morais E.G. und Costa J.A. 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *Biomed. Res. Int.* 2015(835761): 1–15. doi.org/10.1155/2015/835761

- Morozov, G.A. Blokhin V.I., Stakhova N.E., Morozov O.G., Dorogov N.V. und Bizyakin A.S. 2013. Microwave Technology for Treatment Seed. *World J. Agric. Res.* 1(3): 39–43. doi.org/10.12691/wjar-1-3-2
- Mühlroth A., Li K., Røkke G., Winge P. Olsen Y., Hohmann-Marriott M.F., Vadstein O. und Bones A.M. 2013. Pathways of Lipid Metabolism in Marine Algae, Co-Expression Network, Bottlenecks and Candidate Genes for Enhanced Production of EPA and DHA in Species of Chromista. *Mar. Drugs.* 11(11): 4662–4697. doi.org/10.3390/md11114662
- Mussnug J.H., Klassen V., Schlüter A. und Kruse O. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150(1): 61–60. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030
- Myers J.A., Curtis B.S und Curtis W.R. 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophys.* 6(4): 1–15. doi.org/10.1186/2046-1682-6-4
- Navarro E., Robinson C.T., Wagner B. und Behra R. 2007. Influence of Ultraviolet Radiation on UVR-Absorbing Compounds in Freshwater Algal Biofilms and *Scenedesmus vacuolatus* Cultures. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 70(9): 760–767. doi.org/10.1080/15287390701236454
- Nikaido S.S. und Johnson C.H. 2000. Daily and Circadian Variation in Survival From Ultraviolet Radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.* 71(6): 758–765. doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0710758DACVIS2.0.CO2
- Nikolaou A., Hartmann P., Sciandra A., Chachuat B. und Bernard O. 2016. Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae. *J. Theor. Biol.* 390: 61–72. doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.004
- Okumura C., Saffreena N., Rahman M.R., Hasegaw H., Miki O. und Takimoto A. 2014. Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for biofuel production. *Environ. Prog. Sustain. Energy.* 34(1): 269–275. doi.org/10.1002/ep.11951
- Pakhomov, A.G., Akyel, Y., Pakhomova, O.N., Stuck, B.E. and Murphy, M.R. 1998. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. *Bioelectromagnetics.* 19(7): 393–413.
- Perez-Garcia O., Escalante F.M., de-Bashan L.E. und Bashan Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45(1): 11–36. doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037
- Pérez-Pazos J.-V. und Fernández-Izquierdo P. 2011. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro.* 4(4): 47–58.
- Pessoa M.F. 2012. Harmful effects of UV radiation in algae and aquatic macrophytes - A review. *Emir. J. Food Agric.* 24(6): 510–526. doi.org/10.9755/ejfa.v24i6.510526

- Pilon L., Berberoglu H. und Kandilian R. 2011. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *J Quant Spectrosc Radiat Transf.* 112(17): 2639–2660. doi.org/10.1016/j.jqsrt.2011.07.004
- Piorreck M., Baasch K.H. und Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry.* 23(2): 207–216. doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80304-0
- Ragha L., Mishra s., Ramachandran V. und Sigh Bhatia M. 2011. Effects of Low-Power Microwave Fields on Seed Germination and Growth Rate. *Journal of Electromagnetic Analysis and Applications.* 3(5): 165–171. doi.org/10.4236/jemaa.2011.35027
- Rai L.C. und Gaur J.P. 2001. Preface. In: *Algal Adaptations to Environmental Stresses* (Hrsg. Rai L.C. und Gaur J.P.). Berlin Heidelberg: Springer Verlag, Deutschland.
- Ramanan R., Kim B.-H., Cho D., Oh H.-M. und Kim. H.-S. 2016. Algae -bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol Adv.* 34(1): 14–29. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003
- Ramundo-Orlando A. 2010. Effects of Millimeter Waves Radiation on Cell Membrane - A Brief Review. *J. Infrared Milli. Terahz. Waves.* 31(12): 1400–1411. doi.org/10.1007/s10762-010-9731-z
- Rao A.R., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R. und Ravishankar G.A. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* 98(3): 560–564. doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.007
- Rastogi R.P. und Incharoensakdi A. 2014. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU255. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87(1): 244–256. doi.org/10.1111/1574-6941.12220
- Reitan K.I., Rainuzzo J. R. und Olsen Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30(6): 972–979. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x
- Renaud S.M, Parry D.L., Thinh L.V., Kuo. C, Padovan A. und Sammy N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3(1): 43–53. doi.org/10.1007/BF00003918
- Rigano, V.M., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S. und Rigano, C. 1998. The physiological significance of light and dark NH_4^+ - metabolism in *Chlorella sorokinana*. *Phytochemistry.* 47(2): 177–181. doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00569-4
- Rosello Sastre R. und Posten C. 2010. Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chem. Ing. Tech.* 82(2): 1925–1939. doi.org/ 10.1002/cite.201000124

- Sahu A., Pancha I., Jain D., Paliwal C., Ghosh T., Patidar S., Bhattacharya S. und Mishra S. 2013. Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*. 89: 53–58. doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.001
- Sanchez Miron A., Ceron Garcia M.C., Contreras Gomez A., Garcia Camacho F., Molina Grima E. und Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornerutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* 16(3): 287–297. doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00072-X
- Santos A.M., Janssen M., Lamers P.P., Evers W.A.C. und Wijffels RH. 2012. Growth of oil accumulating microalgae *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresour. Technol.* 104: 593–599. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.084
- Scharff C. 2015. Use of Microalgae as renewable resources. *Journal of Central European Green Innovation*. 3(3): 149–156. doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1004.9 HU ISSN 2064-3004
- Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2016. Influence of different light irradiation regimes on growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Acta Hort.* 1110: 91–98. doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1110.14
- Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017a. Cultivation of microalgae in closed systems under artificial lighting. *Acta Hort.* 1170: 1157–1164. doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.149
- Scharff C., Domurath N., Wensch-Dorendorf M. und Schroeder F.-G. 2017b. Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. *Acta Hort.* 1170: 1149–1156. doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.148
- Scharff C., Schroeder F.-G. und Arnold W. 2013. The use of high-frequency electromagnetic radiation for an increased productivity of microalgae in closed systems-a concept. *Acta Hort.* 1004: 93–99. doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1004.9
- Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C, Mussnug J.H., Posten C., Kruse O. und Hankamer B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Res.* 1(1): 20–43. doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8
- Schröder H. 2012. Konzeptionierung einer Versuchsanlage zur Mikrowellenbestrahlung von Mikroalgen. Bachelorarbeit. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Fakultät Landbau/Landespflege, Dresden.
- Schulze P.S.C, Barreira L.A., Pereira H.G.C., Perales J.A. und Varela J.S.C. 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* 32(8): 422–430. doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001

- Seyfabadi, J., Ramezanzpour, Z. und Khoeyi, Z.A. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *C. vulgaris* under different light regimes. *J. Appl. Phycol.* 23(4): 721–726. doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8
- Sforza E., Simionato D., Giacometti G.M., Bertucco A. und Morosinotto T. 2012. Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. *PLoS ONE.* 7(6): e38975. doi.org/10.1371/journal.pone.0038975
- Shanklin J. und Cahoon E.B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611–641. doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.611
- Siaut M., Cui n  S., Cagnon C., Fessler B., Nguyen M., Carrier P., Beyly A., Beisson F., Triantaphyllid s C., Li-Beisson Y. und Peltier G. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* 11(7): 1–15. doi.org/ 10.1186/1472-6750-11-7
- Sinha R.P., Klisch M., Gr niger A. und Häder D.-P. 1998. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B.* 47(2–3): 83–94. doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00198-5
- Slavin V. 2009. Method and device for producing biomass of photosynthesizing microorganisms/ phototrophical algae and biomass of these microorganisms pigments. United States Patent Application Publication, Veröffentlichungsnummer: US 2009/0035835 A1
- Sommer J. 2012. Ausarbeitung von Bypasssystemen zur Behandlung von Mikroalgen mit UV-A- und UV-B-Strahlung. Projektbesprechung im Rahmen des Kooperationsprojektes „Stimulierung von internen Anregungsprozessen in Algen durch eine zusätzliche kontinuierliche oder gepulste UV-Strahlung; Untersuchung der internen Prozesse in Algenzellen bei zusätzlicher UV-Strahlung“. 8.5. 2012
- Strid A., Chow W.S. und Anderson J.M. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum* . *Biochim. Biophys. Acta.* 1020(3): 260–268. doi.org/10.1016/0005-2728(90)90156-X
- Staehelin A. 1966. Die Ultrastruktur der Zellwand und des Chloroplasten von *Chlorella*. *Zeitschrift für Zellforschung* 74: 325–350.
- Sukenik A. und Livne A. 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA Carboxylase in the marine Prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiol.* 32(3): 371–378. doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078090
- Swanson D., Block R. und Mousa S.A. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Adv. Nutr.* 3: 1–7. doi.org/10.3945/an.111.000893
- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs.* 9(6): 1101–1118. doi.org/10.3390/md9061101

- Tambiev A.H. und Skalny A.V. 2012. Electromagnetic radiation and life: bioelementological Point of view. In: Biophysics (Hrsg. Misr A.N). InTech, Kapitel 8: 193–220.
- Thompson G.A.T. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochem. Biophys. Acta.* 1302(1): 17–45. doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8
- Tomaselli L. 2007. The microalgal cell. In: Handbook of microalgal culture-Biotechnology and applied Phycology. (Hrsg. Richmond A.) Oxford: Blackwell Publishing, Großbritannien, 4. Auflage: 3–20.
- Toro J.E. 1989. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquacult. Fish Manage.* 20(3): 249–254. doi.org/10.1111/j.1365-2109.1989.tb00350.x
- Tsuzuki M., Ohnuma E., Sato N., Takaku T. und Kawaguchi A. 1990. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* 93(3): 851–856.
- Vass I., Szilard A. und Sicora C. 2005. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: Handbook of Photosynthesis (Hrsg. Pessaraki M.). Boca Raton: CRC Press, Vereinigte Staaten, 2. Auflage: 827–833. doi.org/10.1201/9781420027877.ch43
- Vigani M., Parisi C., Rodriguez-Cerezo E., Barbosa M.J., Sijtsma L., Pleog M. und Enzig C. 2015. Food and feed products from microalgae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci .Technol.* 42(1): 81–92. doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004
- Vincent W.F. und Neale P.J. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: The Effects of UV Radiation in The Marine Environment (Hrsg. Mora S.J. de, Demers S. und Vernet M.). Cambridge: Cambridge University Press, Großbritannien, 1. Auflage: 149-176.
- Vogel M. 2011. Zur Aufnahme und Bindung von Uran(VI) durch die Grünalge *Chlorella vulgaris*. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften Dresden
- Wagner F. und Falkner G. 2001. Phosphate Limitation. In: Algal Adaptation to Environmental Stresses (Hrsg. Rai L.C. und Gaur J.P.). Berlin Heidelberg: Springer Verlag. Deutschland: 65–110.
- Webb S.J. und Booth A.D. 1969. Absorption of Microwaves by Microorganisms. *Nature.* 222: 1199–1200. doi.org/10.1038/2221199a0
- Weiß M. 2015. Untersuchungen zum Einsatz von UV-Licht bei der Produktion von Mikroalgen. Bachelorarbeit, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Fakultät Landbau/Umwelt/Chemie, Dresden
- Wijanarko A., Dianursanti D., Witarto A.B. und Soemantojo R.W. 2004. Effect of photoperiodicity on CO₂ fixation by *Chlorella vulgaris* Buitenzorg in bubble column photobioreactor for food supplement production. *Makara, Teknologi.* 8(2): 35–43. doi.org/10.7454/mst.v8i2.254

- Winter L. de, Kloka A.J., Francoa M.C., Barbosa M.J. und Wijffels R.H. 2013. The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. *Algal Res.* 2(4): 313–320. doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.001
- Winter L. de, Schepers L.W., Cuaresma M., Barbosa M.J., Martens D.E. und Wijffels R.H. 2014 Circadian rhythms in the cell cycle and biomass composition of *Neochloris oleoabundans* under nitrogen limitation. *J. Biotechnol.* 187: 25–33. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.016
- Winter L. de, Cabanelas I.T.D., Martens D.E., Wijffels R.H. und Barbosa M.J. 2017. The influence of day/night cycles on biomass yield and composition of *Neochloris oleoabundans*. *Biotechnol Biofuels.* 10(104): 1–10. doi.org/10.1186/s13068-017-0762-8
- Winwood R.J. 2013. Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from microalgae. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids.* 20(6): 1–5. doi.org/10.1051/ocl/2013030
- Wu X., Ruan R., Du Z. und Liu Y. 2012. Current Status and Prospects of Biodiesel Production from Microalgae. *Energies.* 5(8): 2667–2682. doi.org/10.3390/en5082667
- Wünschiers R. 2002. The organism. In: H₂-Photobioreactor Project. Online verfügbar: 15.4.15 www.uni-koeln.de/~aei53/PhotoHydrogen/biore_02.htm
- Xin L., Hong-ying H. und Jia Y. 2010a. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *N Biotechnol.* 27(1): 59–63. doi.org/10.1016/j.nbt.2009.11.006
- Xin L., Hong-ying H., Ke G. und Ying-xue S. 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101(14): 5494–5500. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016
- Xu X.-Q. und Beardall J. 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalgae from an antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry.* 45(4): 655–658. doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00868-0
- Xu J. und Gao K. 2010. Use of UV-A energy for photosynthesis in the red macroalga *Gracilaria lemaneiformis*. *Photochem Photobiol.* 86(3): 580–585. doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00709.x.
- Ziegler K. 2012. Untersuchung des Einflusses der Medienzusammensetzung auf das Wachstumsverhalten von Mikroalgen zur Etablierung einer stabilen Kultur am Beispiel von *Chlorella vulgaris*. Masterarbeit, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Fakultät Landbau/Landespflege, Dresden
- Ziel R. 2003. Funktionsprinzip REM-EDX (Rasterelektronenmikroskop - Energiedispersive Röntgenanalyse. Online verfügbar: 10.1.16 de.wikipedia.org/wiki/Datei:Funktionsprinzip_REM.gif

Anhang

A 1 Lichtsättigungskurve

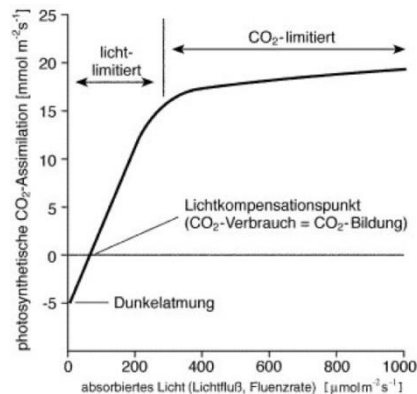


Abb. A 1: Lichtsättigungskurve (Anhäuser 1999)

A 2 Emissionsspektren verwendeter Leuchtmittel

Von den verwendeten Leuchtstoffröhren und der UV-A Lampe wurden die Emissionsspektren mit dem AvaSpec ULS 2048-USB2-UA-50-Spektrometer (Avantes, Appledorn, Niederlande) bestimmt. Das Emissionsspektrum der UV-B-Lampe konnte nicht direkt vermessen werden, da die Röhre in das Behandlungssystem fest integriert war, sodass im Folgenden das Emissionsspektrum des Projektpartner Neon Böhm GmbH angegeben wird. Das Emissionsspektrum der LED wurde auf Basis der Herstellerdaten in eine eigene Darstellung überführt.

Leuchtstoffröhre

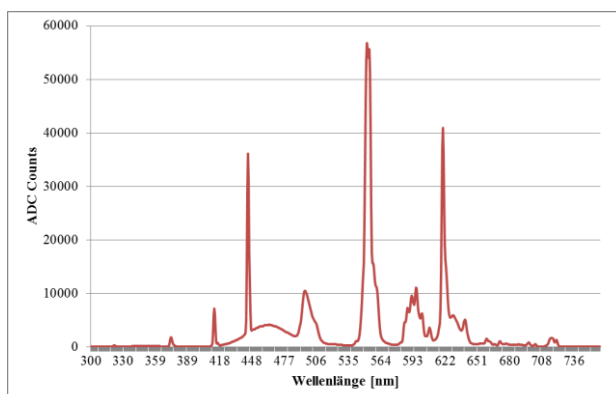


Abb. A 2: Emissionsspektrum Leuchtstoffröhre: Osram, L36 W/840, Lumilux

UV-A-Lampe

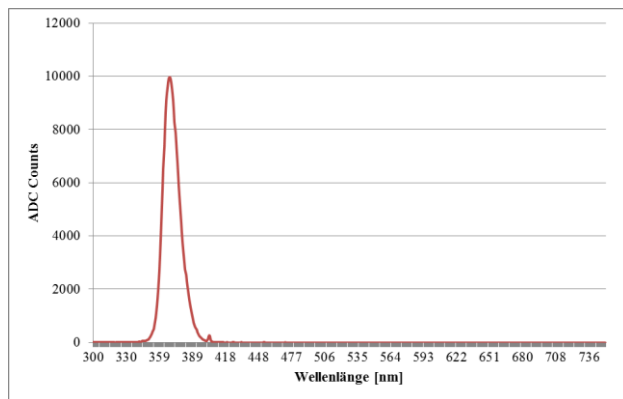


Abb. A 3: Emissionsspektrum UV-A-Lampe: BLB T8/18 LS010 (Peak bei 370 nm)

UV-B-Lampe

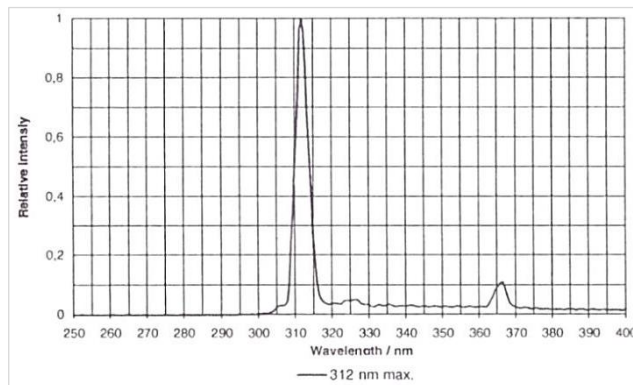


Abb. A 4: Emissionsspektrum UV-B-Lampe mit dem Leuchtstoff (Peak bei 312 nm)

LED

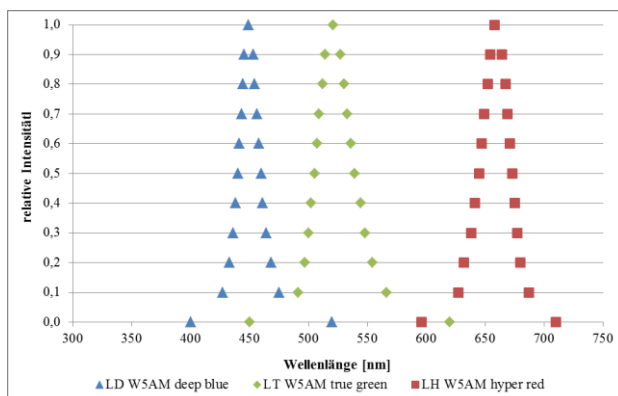


Abb. A 5: Emissionsspektrum der LED mit den eingesetzten Leuchtdioden LD W5AM deep blue (Peak bei 455 nm), LD WAM deep true green (Peak bei 528 nm) und LH W5AM hyper red (Peak bei 657 nm)

A 3 Ergebnisse UV-Bestrahlung

Versuch 1

Dauer: 264 h,
alle Proben: n = 1

Versuch 2

Dauer: 264 h,
Behandlung: n = 1
Kontrolle: n = 2

Versuch 3

Dauer: 264 h,
alle Proben: n = 1
zusätzlich CO₂

Versuch 4

Dauer: 240 h,
Behandlung: n = 1
Kontrolle n = 2

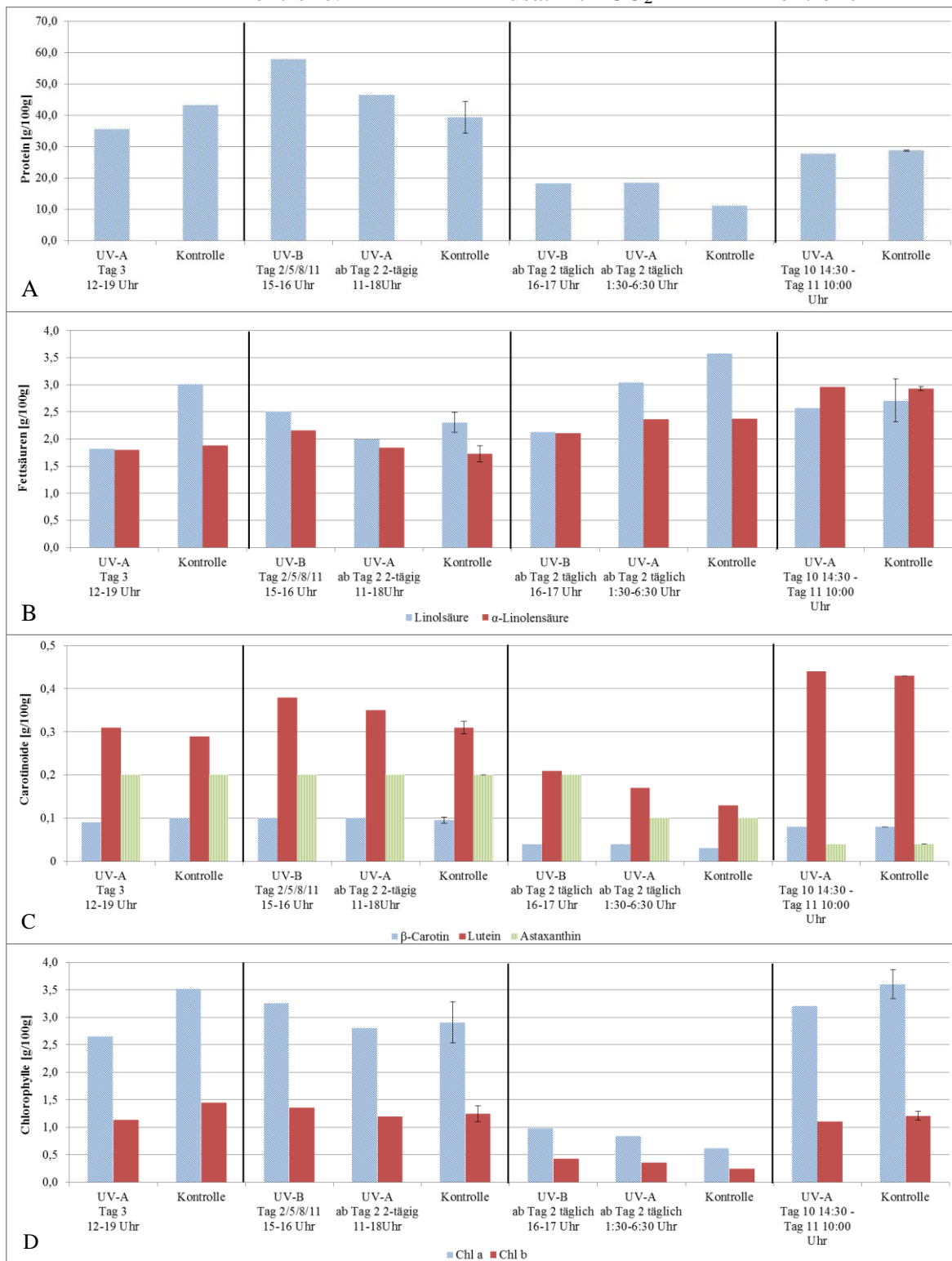


Abb. A 6A-D: Darstellung der Ergebnisse der relativen Anteile untersuchter Inhaltsstoffe von *C. vulgaris* bei verschiedenen UV-A- und UV-B-Behandlungen (A: Proteine, B: Fettsäuren, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Balken stellen Standardabweichung dar, alle UV-Behandlungen n = 1

A 4 Ergebnisse Mikrowellenversuche

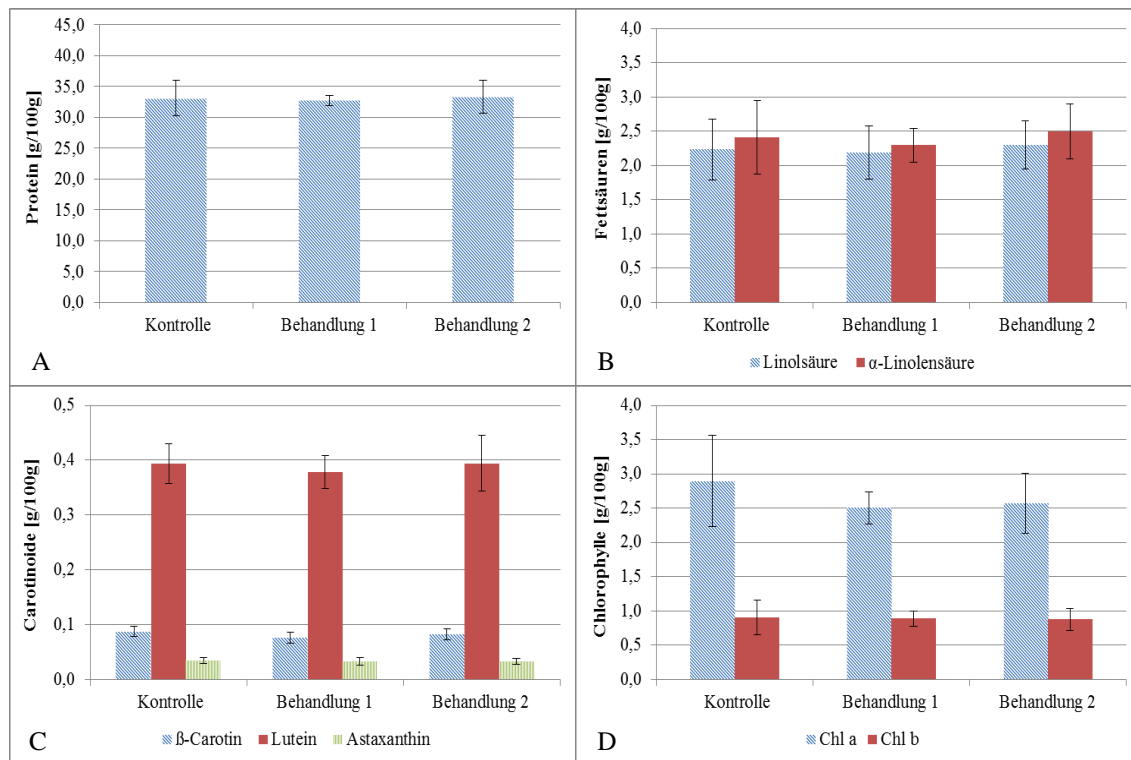


Abb. A 7A-D: Ergebnisse relativer Anteile untersuchter Inhaltsstoffe für *C. vulgaris* (A: Proteine, B: Linol- und α -Linolensäure, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Behandlung 1: 10 x 30 s + 10 x 15 s, Behandlung 2: 15 x 15 s am Tag 10; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 2)

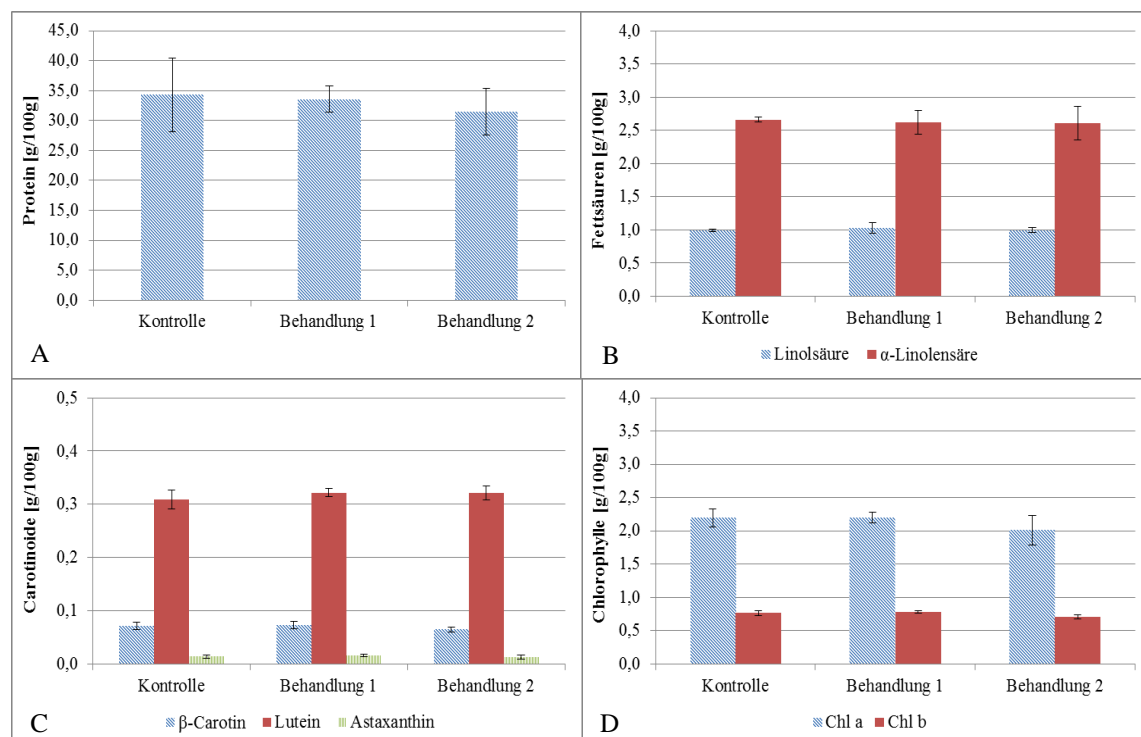


Abb. A 8A-D: Ergebnisse relativer Anteile untersuchter Inhaltsstoffe für *S. obliquus* (A: Proteine, B: Fettsäuren, C: Carotinoide, D: Chlorophylle; Behandlung 1: kontinuierlich bis 38°C, Behandlung 2: 10 x 15 s am Tag 4/7/10, Balken stellen die Standardabweichung dar, n = 2)

A 5 Ergebnisse CO₂-Versuche

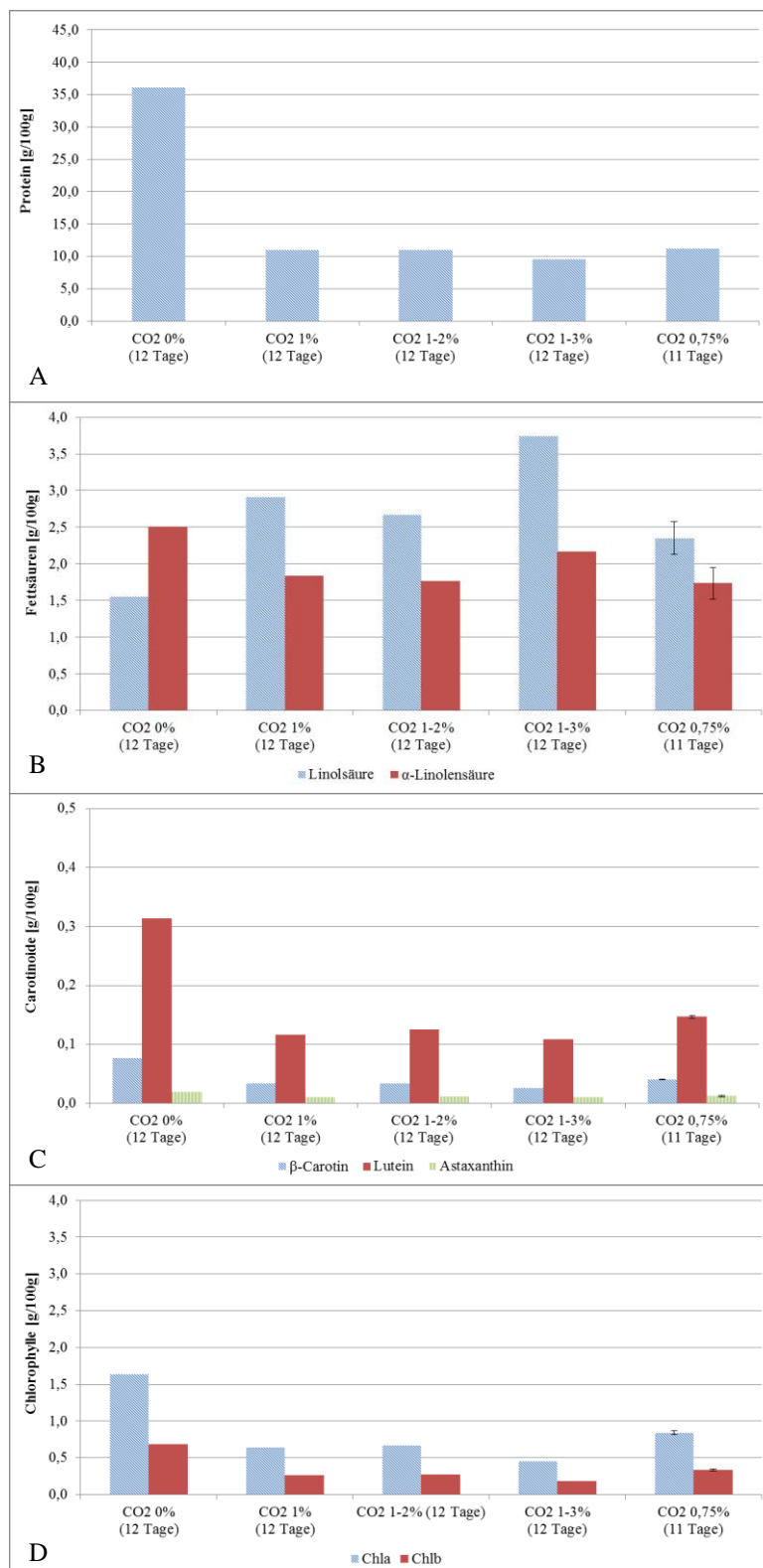


Abb. A 9A-D: Ergebnisse relativer Anteile analysierter Inhaltsstoffe von *C. vulgaris* bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Begasung am Versuchsende nach 264 h (12 Tage, Starttag = Tag 1) bzw. 240 h (11 Tage) (A: Protein, B: Linol- und α-Linolensäure, C: Carotinoide (β-Carotin, Lutein, Astaxanthin), D: Chlorophyll a und b; Balken stellen Standardabweichung dar, n = 1 außer für CO₂, 075%: n = 2

A 6 Auswertung Gesamtlichtintegrals

Tab. A 1: DLI [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$]

DLI	14:0	16:8	18:6	20:4	22:2	24:0/ Nitrat	14:10/ CO ₂	20:4/ LED
<i>C. vulgaris</i>	16,37	-	-	23,39	25,72	28,06	30,74	21,96
<i>S. obliquus</i>	15,44	17,65	19,85	22,06	24,27	26,47		-

Tab. A 2: TLI bezogen auf den zellulären Gehalt von Produkt X ($\text{TLI}_{X,Z}$) für *C. vulgaris* bei einer Intensität von $324,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (FL) bzw. $305,0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LED), n = Stichprobengröße, \pm = Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	$\text{TLI}_{\text{Protein}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	TLI_{LA_Z} [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	$\text{TLI}_{\text{ALA}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	$\text{TLI}_{\beta\text{-Car}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n
FL	14	$4,79\cdot 10^{-14} \pm 1,18\cdot 10^{-14}$	6	$3,00\cdot 10^{-15} \pm 0,69\cdot 10^{-15}$	4	$3,22\cdot 10^{-15} \pm 0,65\cdot 10^{-15}$	4	$1,16\cdot 10^{-16} \pm 0,25\cdot 10^{-16}$	5
FL	20	$2,91\cdot 10^{-14} \pm 0,43\cdot 10^{-14}$	6	$2,23\cdot 10^{-15} \pm 0,44\cdot 10^{-15}$	4	$1,44\cdot 10^{-15} \pm 0,26\cdot 10^{-15}$	4	$0,54\cdot 10^{-16} \pm 0,26\cdot 10^{-16}$	8
FL	22	$2,37\cdot 10^{-14} \pm 0,25\cdot 10^{-14}$	5	$2,88\cdot 10^{-15} \pm 0,48\cdot 10^{-15}$	2	$1,58\cdot 10^{-15} \pm 0,21\cdot 10^{-15}$	2	$0,28\cdot 10^{-16} \pm 0,09\cdot 10^{-16}$	5
FL	24	$2,74\cdot 10^{-14} \pm 0,55\cdot 10^{-14}$	6	$2,51\cdot 10^{-15} \pm 0,36\cdot 10^{-15}$	4	$1,36\cdot 10^{-15} \pm 0,25\cdot 10^{-15}$	4	$0,59\cdot 10^{-16} \pm 0,17\cdot 10^{-16}$	6
FL/CO ₂	14	$1,32\cdot 10^{-14} \pm 0,18\cdot 10^{-14}$	2	$2,92\cdot 10^{-15} \pm 1,45\cdot 10^{-15}$	2	$2,17\cdot 10^{-15} \pm 1,18\cdot 10^{-15}$	2	$0,34\cdot 10^{-16} \pm 0,06\cdot 10^{-16}$	2
LED	20	$2,77\cdot 10^{-14} \pm 0,25\cdot 10^{-14}$	4	$2,25\cdot 10^{-15} \pm 0,54\cdot 10^{-15}$	4	$2,59\cdot 10^{-15} \pm 0,43\cdot 10^{-15}$	4	$0,48\cdot 10^{-16} \pm 0,07\cdot 10^{-16}$	4
FL/Nitrat	24	$7,03\cdot 10^{-14} \pm 0,49\cdot 10^{-14}$	2	$4,17\cdot 10^{-15} \pm 0,22\cdot 10^{-15}$	2	$1,36\cdot 10^{-15} \pm 0,17\cdot 10^{-15}$	2	$1,64\cdot 10^{-16} \pm 0,14\cdot 10^{-16}$	2
Merkmal	Licht [h]	$\text{TLI}_{\text{Lutein}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	$\text{TLI}_{\text{Asta}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	$\text{TLI}_{\text{Chl a}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n	$\text{TLI}_{\text{Chl b}_Z}$ [$\text{g}\cdot\text{Z}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]	n
FL	14	$5,25\cdot 10^{-16} \pm 0,36\cdot 10^{-16}$	5	$0,44\cdot 10^{-16} \pm 0,12\cdot 10^{-16}$	3	$3,77\cdot 10^{-15} \pm 1,13\cdot 10^{-15}$	4	$1,29\cdot 10^{-15} \pm 0,35\cdot 10^{-15}$	4
FL	20	$3,62\cdot 10^{-16} \pm 0,44\cdot 10^{-16}$	8	$0,21\cdot 10^{-16} \pm 0,06\cdot 10^{-16}$	7	$1,93\cdot 10^{-15} \pm 0,32\cdot 10^{-15}$	7	$0,72\cdot 10^{-15} \pm 0,17\cdot 10^{-15}$	7
FL	22	$2,99\cdot 10^{-16} \pm 0,45\cdot 10^{-16}$	5	$0,14\cdot 10^{-16} \pm 0,06\cdot 10^{-16}$	4	$1,83\cdot 10^{-15} \pm 0,27\cdot 10^{-15}$	5	$0,74\cdot 10^{-15} \pm 0,06\cdot 10^{-15}$	5
FL	24	$3,29\cdot 10^{-16} \pm 0,37\cdot 10^{-16}$	6	$0,20\cdot 10^{-16} \pm 0,06\cdot 10^{-16}$	6	$1,75\cdot 10^{-15} \pm 0,07\cdot 10^{-15}$	6	$0,66\cdot 10^{-15} \pm 0,02\cdot 10^{-15}$	6
FL/CO ₂	14	$1,56\cdot 10^{-16} \pm 0,31\cdot 10^{-16}$	2	$0,13\cdot 10^{-16} \pm 0,03\cdot 10^{-16}$	2	$1,00\cdot 10^{-15} \pm 0,25\cdot 10^{-15}$	2	$0,40\cdot 10^{-15} \pm 0,10\cdot 10^{-15}$	2
FL/Nitrat	20	$4,19\cdot 10^{-16} \pm 0,41\cdot 10^{-16}$	4	$0,28\cdot 10^{-16} \pm 0,01\cdot 10^{-16}$	4	$1,59\cdot 10^{-15} \pm 0,16\cdot 10^{-15}$	4	$0,53\cdot 10^{-15} \pm 0,04\cdot 10^{-15}$	4
FL	24	$4,76\cdot 10^{-16} \pm 0,41\cdot 10^{-16}$	2	$0,22\cdot 10^{-16} \pm 0,05\cdot 10^{-16}$	2	$3,72\cdot 10^{-15} \pm 0,22\cdot 10^{-15}$	2	$1,33\cdot 10^{-15} \pm 0,08\cdot 10^{-15}$	2

Tab. A 3: TLI bezogen auf den volumetrischen Ertrag von Produkt X (TLI_X) für *C. vulgaris* bei einer Intensität von 324,8 μmol·m⁻²·s⁻¹ (FL) bzw. 305,0 μmol·m⁻²·s⁻¹ (LED), n = Stichprobengröße, ± = Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	TLI _{Protein} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{LA} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{ALA} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{β-Car} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	2,84·10 ⁻³ ± 0,53·10 ⁻³	6	1,77·10 ⁻⁴ ± 0,54·10 ⁻⁴	4	1,90·10 ⁻⁴ ± 0,54·10 ⁻⁴	4	0,70·10 ⁻⁵ ± 0,10·10 ⁻⁵	5
FL	20	2,36·10 ⁻³ ± 0,45·10 ⁻³	6	2,01·10 ⁻⁴ ± 0,40·10 ⁻⁴	4	1,30·10 ⁻⁴ ± 0,23·10 ⁻⁴	4	0,46·10 ⁻⁵ ± 0,25·10 ⁻⁵	8
FL	22	1,96·10 ⁻³ ± 0,29·10 ⁻³	5	2,60·10 ⁻⁴ ± 0,51·10 ⁻⁴	2	1,42·10 ⁻⁴ ± 0,23·10 ⁻⁴	2	0,23·10 ⁻⁵ ± 0,08·10 ⁻⁵	5
FL	24	2,34·10 ⁻³ ± 0,42·10 ⁻³	6	2,19·10 ⁻⁴ ± 0,30·10 ⁻⁴	4	1,18·10 ⁻⁴ ± 0,20·10 ⁻⁴	4	0,51·10 ⁻⁵ ± 0,16·10 ⁻⁵	6
FL/CO ₂	14	1,63·10 ⁻³ ± 0,17·10 ⁻³	2	3,54·10 ⁻⁴ ± 0,95·10 ⁻⁴	2	2,62·10 ⁻⁴ ± 0,84·10 ⁻⁴	2	0,45·10 ⁻⁵ ± 0,18·10 ⁻⁵	2
LED	20	2,53·10 ⁻³ ± 0,16·10 ⁻³	4	2,05·10 ⁻⁴ ± 0,44·10 ⁻⁴	4	2,37·10 ⁻⁴ ± 0,33·10 ⁻⁴	4	0,43·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁵	4
FL/Nitrat	24	4,85·10 ⁻³ ± 0,01·10 ⁻³	2	2,88·10 ⁻⁴ ± 0,04·10 ⁻⁴	2	0,94·10 ⁻⁴ ± 0,06·10 ⁻⁴	2	1,13·10 ⁻⁵ ± 0,00·10 ⁻⁵	2
Merkmal	Licht [h]	TLI _{Lutein} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Asta} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl a} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl b} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	3,21·10 ⁻⁵ ± 0,42·10 ⁻⁵	5	0,28·10 ⁻⁵ ± 0,05·10 ⁻⁵	3	2,41·10 ⁻⁴ ± 0,56·10 ⁻⁴	4	0,83·10 ⁻⁴ ± 0,16·10 ⁻⁴	4
FL	20	2,98·10 ⁻⁵ ± 0,53·10 ⁻⁵	8	0,18·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁵	7	1,62·10 ⁻⁴ ± 0,31·10 ⁻⁴	7	0,61·10 ⁻⁴ ± 0,15·10 ⁻⁴	7
FL	22	2,47·10 ⁻⁵ ± 0,49·10 ⁻⁵	5	0,12·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁵	4	1,51·10 ⁻⁴ ± 0,24·10 ⁻⁴	5	0,61·10 ⁻⁴ ± 0,05·10 ⁻⁴	5
FL	24	2,82·10 ⁻⁵ ± 0,40·10 ⁻⁵	6	0,17·10 ⁻⁵ ± 0,05·10 ⁻⁵	6	1,49·10 ⁻⁴ ± 0,99·10 ⁻⁴	6	0,57·10 ⁻⁴ ± 0,03·10 ⁻⁴	6
FL/CO ₂	14	1,96·10 ⁻⁵ ± 0,10·10 ⁻⁵	2	0,16·10 ⁻⁵ ± 0,00·10 ⁻⁵	2	1,26·10 ⁻⁴ ± 0,01·10 ⁻⁴	2	0,51·10 ⁻⁴ ± 0,00·10 ⁻⁴	2
LED	20	3,83·10 ⁻⁵ ± 0,03·10 ⁻⁵	4	0,25·10 ⁻⁵ ± 0,01·10 ⁻⁵	4	1,45·10 ⁻⁴ ± 0,12·10 ⁻⁴	4	0,48·10 ⁻⁴ ± 0,03·10 ⁻⁴	4
FL/Nitrat	24	3,28·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁵	2	0,15·10 ⁻⁵ ± 0,00·10 ⁻⁵	2	2,57·10 ⁻⁴ ± 0,02·10 ⁻⁴	2	0,92·10 ⁻⁴ ± 0,01·10 ⁻⁴	2
Merkmal	Licht [h]	TLI _{BTM} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{ZZ} [ZZ·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n				
FL	14	8,69·10 ⁻³ ± 1,47·10 ⁻³	6	3,68·10 ⁸ ± 0,56·10 ⁸	6				
FL	20	9,90·10 ⁻³ ± 1,23·10 ⁻³	12	3,50·10 ⁸ ± 0,48·10 ⁸	12				
FL	22	9,89·10 ⁻³ ± 1,16·10 ⁻³	8	3,35·10 ⁸ ± 0,25·10 ⁸	8				
FL	24	9,61·10 ⁻³ ± 1,06·10 ⁻³	10	2,93·10 ⁸ ± 0,25·10 ⁸	10				
FL/CO ₂	14	15,48·10 ⁻³ ± 1,20·10 ⁻³	3	4,14·10 ⁸ ± 0,77·10 ⁸	3				
LED	20	12,67·10 ⁻³ ± 0,03·10 ⁻³	4	4,17·10 ⁸ ± 0,13·10 ⁸	4				
FL/Nitrat	24	7,54·10 ⁻³ ± 0,03·10 ⁻³	2	2,46·10 ⁸ ± 0,16·10 ⁸	2				

Tab. A 4: TLI bezogen auf den zellulären Gehalt von Produkt X (TLI_X) für *S. obliquus* bei einer Intensität von 306,4 μmol·m⁻²·s⁻¹ (FL), n = Stichprobengröße, ± = Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	TLI _{Protein_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{LA_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{ALA_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{β-Car_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	9,98·10 ⁻¹⁴ ± 1,60·10 ⁻¹⁴	5	3,32·10 ⁻¹⁵ ± 0,72·10 ⁻¹⁵	3	7,53·10 ⁻¹⁵ ± 0,56·10 ⁻¹⁵	3	1,94·10 ⁻¹⁶ ± 0,81·10 ⁻¹⁶	5
FL	16	8,47·10 ⁻¹⁴ ± 1,24·10 ⁻¹⁴	4	3,01·10 ⁻¹⁵ ± 0,32·10 ⁻¹⁵	4	6,17·10 ⁻¹⁵ ± 1,12·10 ⁻¹⁵	4	2,00·10 ⁻¹⁶ ± 0,10·10 ⁻¹⁶	4
FL	18	7,60·10 ⁻¹⁴ ± 1,10·10 ⁻¹⁴	6	2,16·10 ⁻¹⁵ ± 0,34·10 ⁻¹⁵	4	5,90·10 ⁻¹⁵ ± 0,75·10 ⁻¹⁵	4	1,90·10 ⁻¹⁶ ± 0,50·10 ⁻¹⁶	6
FL	20	5,89·10 ⁻¹⁴ ± 0,48·10 ⁻¹⁴	4	2,99·10 ⁻¹⁵ ± 0,28·10 ⁻¹⁵	2	6,49·10 ⁻¹⁵ ± 0,03·10 ⁻¹⁵	2	1,05·10 ⁻¹⁶ ± 0,40·10 ⁻¹⁶	4
FL	22	6,67·10 ⁻¹⁴ ± 0,67·10 ⁻¹⁴	4	n. b.	-	n. b.	-	0,96·10 ⁻¹⁶ ± 0,30·10 ⁻¹⁶	4
FL	24	4,55·10 ⁻¹⁴ ± 0,37·10 ⁻¹⁴	4	2,45·10 ⁻¹⁵ ± 0,44·10 ⁻¹⁵	4	3,88·10 ⁻¹⁵ ± 0,77·10 ⁻¹⁵	4	0,97·10 ⁻¹⁶ ± 0,31·10 ⁻¹⁶	4
Merkmal	Licht [h]	TLI _{Lutein_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Asta_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl a_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl b_Z} [g·Z ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	9,96·10 ⁻¹⁶ ± 1,43·10 ⁻¹⁶	5	0,44·10 ⁻¹⁶ ± 0,18·10 ⁻¹⁶	5	7,12·10 ⁻¹⁵ ± 0,66·10 ⁻¹⁵	5	2,62·10 ⁻¹⁵ ± 0,29·10 ⁻¹⁵	5
FL	16	9,24·10 ⁻¹⁶ ± 1,55·10 ⁻¹⁶	4	0,56·10 ⁻¹⁶ ± 0,21·10 ⁻¹⁶	4	5,94·10 ⁻¹⁵ ± 1,14·10 ⁻¹⁵	4	2,29·10 ⁻¹⁵ ± 0,43·10 ⁻¹⁵	4
FL	18	8,27·10 ⁻¹⁶ ± 1,42·10 ⁻¹⁶	6	0,43·10 ⁻¹⁶ ± 0,13·10 ⁻¹⁶	6	4,98·10 ⁻¹⁵ ± 0,88·10 ⁻¹⁵	6	1,84·10 ⁻¹⁵ ± 0,35·10 ⁻¹⁵	6
FL	20	6,94·10 ⁻¹⁶ ± 0,45·10 ⁻¹⁶	4	0,32·10 ⁻¹⁶ ± 0,23·10 ⁻¹⁶	4	3,62·10 ⁻¹⁵ ± 0,21·10 ⁻¹⁵	4	1,42·10 ⁻¹⁵ ± 0,06·10 ⁻¹⁵	4
FL	22	7,72·10 ⁻¹⁶ ± 1,19·10 ⁻¹⁶	4	0,28·10 ⁻¹⁶ ± 0,19·10 ⁻¹⁶	4	3,81·10 ⁻¹⁵ ± 0,54·10 ⁻¹⁵	4	1,43·10 ⁻¹⁵ ± 0,19·10 ⁻¹⁵	4
FL	24	5,62·10 ⁻¹⁶ ± 0,38·10 ⁻¹⁶	4	0,35·10 ⁻¹⁶ ± 0,17·10 ⁻¹⁶	4	3,01·10 ⁻¹⁵ ± 0,23·10 ⁻¹⁵	4	1,14·10 ⁻¹⁵ ± 0,11·10 ⁻¹⁵	4

Tab. A 5: TLI bezogen auf den volumetrischen Ertrag von Produkt X (TLI_X) für *S. obliquus* bei einer Intensität von 306,4 μmol·m⁻²·s⁻¹ (FL), n = Stichprobengröße, ± = Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	TLI _{Protein} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{LA} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{ALA} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{β-Car} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	3,22·10 ⁻³ ± 0,77·10 ⁻³	5	1,03·10 ⁻⁴ ± 0,17·10 ⁻⁴	3	2,36·10 ⁻⁴ ± 0,40·10 ⁻⁴	3	0,61·10 ⁻⁵ ± 0,24·10 ⁻⁵	5
FL	16	2,88·10 ⁻³ ± 0,34·10 ⁻³	4	1,02·10 ⁻⁴ ± 0,08·10 ⁻⁴	4	2,12·10 ⁻⁴ ± 0,49·10 ⁻⁴	4	0,68·10 ⁻⁵ ± 0,02·10 ⁻⁵	4
FL	18	2,63·10 ⁻³ ± 0,50·10 ⁻³	6	0,73·10 ⁻⁴ ± 0,06·10 ⁻⁴	4	2,02·10 ⁻⁴ ± 0,20·10 ⁻⁴	4	0,65·10 ⁻⁵ ± 0,15·10 ⁻⁵	6
FL	20	2,25·10 ⁻³ ± 0,12·10 ⁻³	4	1,17·10 ⁻⁴ ± 0,08·10 ⁻⁴	2	2,54·10 ⁻⁴ ± 0,05·10 ⁻⁴	2	0,41·10 ⁻⁵ ± 0,17·10 ⁻⁵	4
FL	22	2,29·10 ⁻³ ± 0,22·10 ⁻³	4	n. b.	-	n. b.	-	0,33·10 ⁻⁵ ± 0,07·10 ⁻⁵	4
FL	24	1,86·10 ⁻³ ± 0,18·10 ⁻³	4	0,99·10 ⁻⁴ ± 0,08·10 ⁻⁴	4	1,57·10 ⁻⁴ ± 0,21·10 ⁻⁴	4	0,39·10 ⁻⁵ ± 0,09·10 ⁻⁵	4
Merkmal	Licht [h]	TLI _{Lutein} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Asta} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl a} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{Chl b} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n
FL	14	3,20·10 ⁻⁵ ± 0,62·10 ⁻⁵	5	0,14·10 ⁻⁵ ± 0,05·10 ⁻⁵	5	2,26·10 ⁻⁴ ± 0,11·10 ⁻⁴	5	0,83·10 ⁻⁴ ± 0,04·10 ⁻⁴	5
FL	16	3,14·10 ⁻⁵ ± 0,40·10 ⁻⁵	4	0,19·10 ⁻⁵ ± 0,08·10 ⁻⁵	4	2,01·10 ⁻⁴ ± 0,28·10 ⁻⁴	4	0,78·10 ⁻⁴ ± 0,11·10 ⁻⁴	4
FL	18	2,86·10 ⁻⁵ ± 0,55·10 ⁻⁵	6	0,15·10 ⁻⁵ ± 0,04·10 ⁻⁵	6	1,72·10 ⁻⁴ ± 0,34·10 ⁻⁴	6	0,64·10 ⁻⁴ ± 0,14·10 ⁻⁴	6
FL	20	2,66·10 ⁻⁵ ± 0,10·10 ⁻⁵	4	0,13·10 ⁻⁵ ± 0,09·10 ⁻⁵	4	1,39·10 ⁻⁴ ± 0,06·10 ⁻⁴	4	0,54·10 ⁻⁴ ± 0,02·10 ⁻⁴	4
FL	22	2,63·10 ⁻⁵ ± 0,16·10 ⁻⁵	4	0,09·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁵	4	1,30·10 ⁻⁴ ± 0,10·10 ⁻⁴	4	0,49·10 ⁻⁴ ± 0,04·10 ⁻⁴	4
FL	24	2,30·10 ⁻⁵ ± 0,26·10 ⁻⁵	4	0,14·10 ⁻⁵ ± 0,06·10 ⁻⁶	4	1,23·10 ⁻⁴ ± 0,06·10 ⁻⁴	4	0,46·10 ⁻⁴ ± 0,02·10 ⁻⁴	4
Merkmal	Licht [h]	TLI _{BTM} [g·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n	TLI _{ZZ} [ZZ·l ⁻¹ ·mol·m ⁻²]	n				
FL	14	10,66·10 ⁻³ ± 0,71·10 ⁻³	6	2,02·10 ⁸ ± 0,24·10 ⁸	6				
FL	16	10,31·10 ⁻³ ± 0,28·10 ⁻³	4	1,93·10 ⁸ ± 0,10·10 ⁸	4				
FL	18	9,50·10 ⁻³ ± 0,81·10 ⁻³	6	1,74·10 ⁸ ± 0,20·10 ⁸	6				
FL	20	9,94·10 ⁻³ ± 0,74·10 ⁻³	4	1,74·10 ⁸ ± 0,07·10 ⁸	4				
FL	22	9,25·10 ⁻³ ± 0,52·10 ⁻³	4	1,42·10 ⁸ ± 0,16·10 ⁸	4				
FL	24	9,68·10 ⁻³ ± 0,56·10 ⁻³	4	1,55·10 ⁸ ± 0,17·10 ⁸	4				

A 7 Zellgehalt und volumetrischer Ertrag

Die zellulären und volumetrischen Gehalte ergeben sich durch Verrechnung mit den zugehörigen Zellkonzentrationen und Biomasserträgen, in denen der Parameter Inhaltsstoff und Biomasse bzw. Zellzahl ermittelt wurde.

Tab. A 6: Mittlerer Zellgehalt der Inhaltsstoffe in *C. vulgaris* nach 240 h, n = Stichprobenzahl, ± Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	Protein [g·Zelle⁻¹]	n	LA [g·Zelle⁻¹]	n	ALA [g·Zelle⁻¹]	n	β-Car [g·Zelle⁻¹]	n
FL	14	$0,78 \cdot 10^{-11} \pm 0,19 \cdot 10^{-11}$	6	$4,91 \cdot 10^{-13} \pm 1,13 \cdot 10^{-13}$	4	$5,27 \cdot 10^{-13} \pm 1,07 \cdot 10^{-13}$	4	$1,90 \cdot 10^{-14} \pm 0,41 \cdot 10^{-14}$	5
FL	20	$0,68 \cdot 10^{-11} \pm 0,10 \cdot 10^{-11}$	6	$5,21 \cdot 10^{-13} \pm 1,03 \cdot 10^{-13}$	4	$3,36 \cdot 10^{-13} \pm 0,60 \cdot 10^{-13}$	4	$1,26 \cdot 10^{-14} \pm 0,60 \cdot 10^{-14}$	8
FL	22	$0,61 \cdot 10^{-11} \pm 0,07 \cdot 10^{-11}$	5	$7,42 \cdot 10^{-13} \pm 1,23 \cdot 10^{-13}$	2	$4,06 \cdot 10^{-13} \pm 0,53 \cdot 10^{-13}$	2	$0,72 \cdot 10^{-14} \pm 0,23 \cdot 10^{-14}$	5
FL	24	$0,77 \cdot 10^{-11} \pm 0,16 \cdot 10^{-11}$	6	$7,06 \cdot 10^{-13} \pm 1,00 \cdot 10^{-13}$	4	$3,82 \cdot 10^{-13} \pm 0,71 \cdot 10^{-13}$	4	$1,65 \cdot 10^{-14} \pm 0,49 \cdot 10^{-14}$	6
FL/CO ₂	14	$0,40 \cdot 10^{-11} \pm 0,05 \cdot 10^{-11}$	2	$8,85 \cdot 10^{-13} \pm 4,39 \cdot 10^{-13}$	2	$6,59 \cdot 10^{-13} \pm 3,60 \cdot 10^{-13}$	2	$1,02 \cdot 10^{-14} \pm 0,18 \cdot 10^{-14}$	2
LED	20	$0,61 \cdot 10^{-11} \pm 0,06 \cdot 10^{-11}$	4	$4,94 \cdot 10^{-13} \pm 1,18 \cdot 10^{-13}$	4	$5,69 \cdot 10^{-13} \pm 0,95 \cdot 10^{-13}$	4	$1,06 \cdot 10^{-14} \pm 0,14 \cdot 10^{-14}$	4
FL/Nitrat	24	$1,97 \cdot 10^{-11} \pm 0,14 \cdot 10^{-11}$	2	$11,70 \cdot 10^{-13} \pm 0,62 \cdot 10^{-13}$	2	$3,99 \cdot 10^{-13} \pm 0,48 \cdot 10^{-13}$	2	$4,60 \cdot 10^{-14} \pm 0,32 \cdot 10^{-14}$	2
Merkmal	Licht [h]	Lutein [g·Zelle⁻¹]	n	Asta [g·Zelle⁻¹]	n	Chl a [g·Zelle⁻¹]	n	Chl b [g·Zelle⁻¹]	n
FL	14	$8,60 \cdot 10^{-14} \pm 0,58 \cdot 10^{-14}$	5	$0,73 \cdot 10^{-14} \pm 0,20 \cdot 10^{-14}$	3	$6,17 \cdot 10^{-13} \pm 1,84 \cdot 10^{-13}$	4	$2,11 \cdot 10^{-13} \pm 0,57 \cdot 10^{-13}$	4
FL	20	$8,46 \cdot 10^{-14} \pm 1,04 \cdot 10^{-14}$	8	$0,49 \cdot 10^{-14} \pm 0,15 \cdot 10^{-14}$	7	$4,52 \cdot 10^{-13} \pm 0,78 \cdot 10^{-13}$	7	$1,68 \cdot 10^{-13} \pm 0,39 \cdot 10^{-13}$	7
FL	22	$7,69 \cdot 10^{-14} \pm 1,15 \cdot 10^{-14}$	5	$0,37 \cdot 10^{-14} \pm 0,15 \cdot 10^{-14}$	4	$4,72 \cdot 10^{-13} \pm 0,68 \cdot 10^{-13}$	5	$1,90 \cdot 10^{-13} \pm 0,16 \cdot 10^{-13}$	5
FL	24	$9,24 \cdot 10^{-14} \pm 1,03 \cdot 10^{-14}$	6	$0,55 \cdot 10^{-14} \pm 0,16 \cdot 10^{-14}$	6	$4,90 \cdot 10^{-13} \pm 0,20 \cdot 10^{-13}$	6	$1,86 \cdot 10^{-13} \pm 0,06 \cdot 10^{-13}$	6
FL/CO ₂	14	$4,72 \cdot 10^{-14} \pm 0,93 \cdot 10^{-14}$	2	$0,38 \cdot 10^{-14} \pm 0,10 \cdot 10^{-14}$	2	$3,04 \cdot 10^{-13} \pm 0,77 \cdot 10^{-13}$	2	$1,22 \cdot 10^{-13} \pm 0,30 \cdot 10^{-13}$	2
LED	20	$9,20 \cdot 10^{-14} \pm 0,89 \cdot 10^{-14}$	4	$0,61 \cdot 10^{-14} \pm 0,03 \cdot 10^{-14}$	4	$3,48 \cdot 10^{-13} \pm 0,35 \cdot 10^{-13}$	4	$1,16 \cdot 10^{-13} \pm 0,09 \cdot 10^{-13}$	4
FL/Nitrat	24	$13,35 \cdot 10^{-14} \pm 1,12 \cdot 10^{-14}$	2	$0,61 \cdot 10^{-14} \pm 0,04 \cdot 10^{-14}$	2	$10,44 \cdot 10^{-13} \pm 0,62 \cdot 10^{-13}$	2	$3,74 \cdot 10^{-13} \pm 0,22 \cdot 10^{-13}$	2

Tab. A 7: Mittlerer Zellgehalt der Inhaltstoffe in *S. obliquus*, n = Stichprobenzahl, ± Standardabweichung, n. b. = nicht bestimmt

Merkmal	Licht [h]	Protein [g·Zelle⁻¹]	n	LA [g·Zelle⁻¹]	n	ALA [g·Zelle⁻¹]	n	β-Car [g·Zelle⁻¹]	n
FL	14	$1,63 \cdot 10^{-11} \pm 0,26 \cdot 10^{-11}$	5	$5,44 \cdot 10^{-13} \pm 1,17 \cdot 10^{-13}$	3	$12,33 \cdot 10^{-13} \pm 0,92 \cdot 10^{-13}$	3	$3,17 \cdot 10^{-14} \pm 1,32 \cdot 10^{-14}$	5
FL	16	$1,59 \cdot 10^{-11} \pm 0,23 \cdot 10^{-11}$	4	$5,63 \cdot 10^{-13} \pm 0,59 \cdot 10^{-13}$	4	$11,53 \cdot 10^{-13} \pm 2,09 \cdot 10^{-13}$	4	$3,74 \cdot 10^{-14} \pm 0,18 \cdot 10^{-14}$	4
FL	18	$1,60 \cdot 10^{-11} \pm 0,23 \cdot 10^{-11}$	6	$4,54 \cdot 10^{-13} \pm 0,72 \cdot 10^{-13}$	4	$12,43 \cdot 10^{-13} \pm 1,57 \cdot 10^{-13}$	4	$4,00 \cdot 10^{-14} \pm 1,04 \cdot 10^{-14}$	6
FL	20	$1,38 \cdot 10^{-11} \pm 0,11 \cdot 10^{-11}$	4	$6,99 \cdot 10^{-13} \pm 0,65 \cdot 10^{-13}$	2	$15,17 \cdot 10^{-13} \pm 0,06 \cdot 10^{-13}$	2	$2,45 \cdot 10^{-14} \pm 0,93 \cdot 10^{-14}$	4
FL	22	$1,72 \cdot 10^{-11} \pm 0,17 \cdot 10^{-11}$	4	n. b.	-	n. b.	-	$2,48 \cdot 10^{-14} \pm 0,77 \cdot 10^{-14}$	4
FL	24	$1,28 \cdot 10^{-11} \pm 0,11 \cdot 10^{-11}$	4	$6,86 \cdot 10^{-13} \pm 1,22 \cdot 10^{-13}$	4	$10,89 \cdot 10^{-13} \pm 2,17 \cdot 10^{-13}$	4	$2,72 \cdot 10^{-14} \pm 0,88 \cdot 10^{-14}$	4
Merkmal	Licht [h]	Lutein [g·Zelle⁻¹]	n	Asta [g·Zelle⁻¹]	n	Chl a [g·Zelle⁻¹]	n	Chl b [g·Zelle⁻¹]	n
FL	14	$16,30 \cdot 10^{-14} \pm 2,35 \cdot 10^{-14}$	5	$0,72 \cdot 10^{-14} \pm 0,30 \cdot 10^{-14}$	5	$11,66 \cdot 10^{-13} \pm 1,08 \cdot 10^{-13}$	5	$4,28 \cdot 10^{-13} \pm 0,48 \cdot 10^{-13}$	5
FL	16	$17,29 \cdot 10^{-14} \pm 2,90 \cdot 10^{-14}$	4	$1,05 \cdot 10^{-14} \pm 0,39 \cdot 10^{-14}$	4	$11,10 \cdot 10^{-13} \pm 2,14 \cdot 10^{-13}$	4	$4,29 \cdot 10^{-13} \pm 0,81 \cdot 10^{-13}$	4
FL	18	$17,40 \cdot 10^{-14} \pm 2,99 \cdot 10^{-14}$	6	$0,90 \cdot 10^{-14} \pm 0,27 \cdot 10^{-14}$	6	$10,48 \cdot 10^{-12} \pm 1,85 \cdot 10^{-13}$	6	$3,87 \cdot 10^{-13} \pm 0,75 \cdot 10^{-13}$	6
FL	20	$16,23 \cdot 10^{-14} \pm 1,04 \cdot 10^{-14}$	4	$0,76 \cdot 10^{-14} \pm 0,53 \cdot 10^{-14}$	4	$8,47 \cdot 10^{-13} \pm 0,49 \cdot 10^{-13}$	4	$3,32 \cdot 10^{-13} \pm 0,15 \cdot 10^{-13}$	4
FL	22	$19,85 \cdot 10^{-14} \pm 3,06 \cdot 10^{-14}$	4	$0,72 \cdot 10^{-14} \pm 0,50 \cdot 10^{-14}$	4	$9,80 \cdot 10^{-13} \pm 1,38 \cdot 10^{-13}$	4	$3,69 \cdot 10^{-13} \pm 0,48 \cdot 10^{-13}$	4
FL	24	$15,78 \cdot 10^{-13} \pm 1,06 \cdot 10^{-14}$	4	$0,97 \cdot 10^{-14} \pm 0,47 \cdot 10^{-14}$	4	$8,45 \cdot 10^{-13} \pm 0,64 \cdot 10^{-13}$	4	$3,19 \cdot 10^{-13} \pm 0,30 \cdot 10^{-13}$	4

Tab. A 8: Mittlerer volumetrische Ertrag der Inhaltsstoffe mit *C. vulgaris* nach 240 h, n = Stichprobenzahl, ± Standardabweichung

Merkmal	Licht [h]	Protein [g·l⁻¹]	n	LA [g·l⁻¹]	n	ALA [g·l⁻¹]	n	β-Car [g·l⁻¹]	n
FL	14	46,27·10 ⁻² ± 8,64·10 ⁻²	6	2,90·10 ⁻² ± 0,88·10 ⁻²	4	3,12·10 ⁻² ± 0,88·10 ⁻²	4	1,14·10 ⁻³ ± 0,16·10 ⁻³	5
FL	20	55,41·10 ⁻² ± 10,58·10 ⁻²	6	4,70·10 ⁻² ± 0,93·10 ⁻²	4	3,03·10 ⁻² ± 0,54·10 ⁻²	4	1,07·10 ⁻³ ± 0,59·10 ⁻³	8
FL	22	50,42·10 ⁻² ± 7,34·10 ⁻²	5	6,68·10 ⁻² ± 1,30·10 ⁻²	2	3,65·10 ⁻² ± 0,58·10 ⁻²	2	0,60·10 ⁻³ ± 0,21·10 ⁻³	5
FL	24	65,50·10 ⁻² ± 11,66·10 ⁻²	6	6,13·10 ⁻² ± 0,85·10 ⁻²	4	3,31·10 ⁻² ± 0,57·10 ⁻²	4	1,42·10 ⁻³ ± 0,44·10 ⁻³	6
FL/CO ₂	14	49,47·10 ⁻² ± 5,20·10 ⁻²	3	10,74·10 ⁻² ± 2,87·10 ⁻²	2	7,94·10 ⁻² ± 2,56·10 ⁻²	2	1,35·10 ⁻³ ± 0,55·10 ⁻³	2
LED	20	54,37·10 ⁻² ± 29,18·10 ⁻²	4	4,40·10 ⁻² ± 0,09·10 ⁻²	4	5,08·10 ⁻² ± 0,66·10 ⁻²	4	0,95·10 ⁻³ ± 0,16·10 ⁻³	4
FL/Nitrat	24	136,05·10 ⁻² ± 0,49·10 ⁻²	2	8,07·10 ⁻² ± 0,11·10 ⁻²	2	2,62·10 ⁻² ± 0,16·10 ⁻²	2	3,17·10 ⁻³ ± 0,01·10 ⁻³	2
Merkmal	Licht [h]	Lutein [g·l⁻¹]	n	Asta [g·l⁻¹]	n	Chl a [g·l⁻¹]	n	Chl b [g·l⁻¹]	n
FL	14	5,26·10 ⁻³ ± 0,69·10 ⁻³	5	0,46·10 ⁻³ ± 0,09·10 ⁻³	3	3,95·10 ⁻² ± 0,91·10 ⁻²	4	1,35·10 ⁻² ± 0,27·10 ⁻²	4
FL	20	6,97·10 ⁻³ ± 1,23·10 ⁻³	8	0,41·10 ⁻³ ± 0,13·10 ⁻³	7	3,79·10 ⁻² ± 0,73·10 ⁻²	7	1,41·10 ⁻² ± 0,35·10 ⁻²	7
FL	22	6,37·10 ⁻³ ± 1,25·10 ⁻³	5	0,31·10 ⁻³ ± 0,14·10 ⁻³	4	3,89·10 ⁻² ± 0,63·10 ⁻²	5	1,56·10 ⁻² ± 0,12·10 ⁻²	5
FL	24	7,92·10 ⁻³ ± 1,12·10 ⁻³	6	0,47·10 ⁻³ ± 0,15·10 ⁻³	6	4,19·10 ⁻² ± 0,28·10 ⁻²	6	1,59·10 ⁻² ± 0,09·10 ⁻²	6
FL/CO ₂	14	5,95·10 ⁻³ ± 0,30·10 ⁻³	2	0,48·10 ⁻³ ± 0,00·10 ⁻³	2	3,80·10 ⁻² ± 0,03·10 ⁻²	2	1,53·10 ⁻² ± 0,00·10 ⁻²	2
LED	20	8,23·10 ⁻³ ± 0,68·10 ⁻³	4	0,54·10 ⁻³ ± 0,00·10 ⁻³	4	3,12·10 ⁻² ± 0,00·10 ⁻²	4	1,04·10 ⁻² ± 0,01·10 ⁻²	4
FL/Nitrat	24	9,20·10 ⁻³ ± 0,18·10 ⁻³	2	0,42·10 ⁻³ ± 0,00·10 ⁻³	2	7,20·10 ⁻² ± 0,05·10 ⁻²	2	2,58·10 ⁻² ± 0,02·10 ⁻²	2

Tab. A 9: Mittlerer volumetrische Ertrag der Inhaltsstoffe mit *S. obliquus* nach 240 h, n = Stichprobenzahl, ± Standardabweichung, n. b. = nicht bestimmt

Merkmal	Licht [h]	Protein [g·l ⁻¹]		LA [g·l ⁻¹]		ALA [g·l ⁻¹]		β-Car [g·l ⁻¹]	n
FL	14	52,71·10 ⁻² ± 12,66·10 ⁻²	5	1,68·10 ⁻² ± 0,28·10 ⁻²	3	3,86·10 ⁻² ± 0,66·10 ⁻²	3	1,00·10 ⁻³ ± 0,39·10 ⁻³	5
FL	16	53,90·10 ⁻² ± 6,42·10 ⁻²	4	1,92·10 ⁻² ± 0,15·10 ⁻²	4	3,96·10 ⁻² ± 0,92·10 ⁻²	4	1,27·10 ⁻³ ± 0,04·10 ⁻³	4
FL	18	55,45·10 ⁻² ± 10,56·10 ⁻²	6	1,54·10 ⁻² ± 0,13·10 ⁻²	4	4,24·10 ⁻² ± 0,41·10 ⁻²	4	1,37·10 ⁻³ ± 0,32·10 ⁻³	6
FL	20	52,70·10 ⁻² ± 2,78·10 ⁻²	4	2,74·10 ⁻² ± 0,19·10 ⁻²	2	5,95·10 ⁻² ± 0,11·10 ⁻²	2	0,95·10 ⁻³ ± 0,39·10 ⁻³	4
FL	22	58,93·10 ⁻² ± 5,56·10 ⁻²	4	n. b.	-	n. b.	-	0,84·10 ⁻³ ± 0,18·10 ⁻³	4
FL	24	52,14·10 ⁻² ± 5,00·10 ⁻²	4	2,77·10 ⁻² ± 0,21·10 ⁻²	4	4,41·10 ⁻² ± 0,58·10 ⁻²	4	1,09·10 ⁻³ ± 0,25·10 ⁻³	4
Merkmal	Licht [h]	Lutein [g·l ⁻¹]		Asta [g·l ⁻¹]		Chl a [g·l ⁻¹]		Chl b [g·l ⁻¹]	n
FL	14	5,23·10 ⁻³ ± 1,02·10 ⁻³	5	0,22·10 ⁻³ ± 0,08·10 ⁻³	5	3,70·10 ⁻² ± 0,18·10 ⁻²	5	1,36·10 ⁻² ± 0,07·10 ⁻²	5
FL	16	5,87·10 ⁻³ ± 0,75·10 ⁻³	4	0,36·10 ⁻³ ± 0,15·10 ⁻³	4	3,76·10 ⁻² ± 0,53·10 ⁻²	4	1,45·10 ⁻² ± 0,20·10 ⁻²	4
FL	18	6,01·10 ⁻³ ± 1,15·10 ⁻³	6	0,31·10 ⁻³ ± 0,09·10 ⁻³	6	3,63·10 ⁻² ± 0,72·10 ⁻²	6	1,34·10 ⁻² ± 0,30·10 ⁻²	6
FL	20	6,21·10 ⁻³ ± 0,24·10 ⁻³	4	0,30·10 ⁻³ ± 0,21·10 ⁻³	4	3,24·10 ⁻² ± 0,14·10 ⁻²	4	1,27·10 ⁻² ± 0,05·10 ⁻²	4
FL	22	6,77·10 ⁻³ ± 0,41·10 ⁻³	4	0,24·10 ⁻³ ± 0,15·10 ⁻³	4	3,35·10 ⁻² ± 0,25·10 ⁻²	4	1,26·10 ⁻² ± 0,10·10 ⁻²	4
FL	24	6,45·10 ⁻³ ± 0,72·10 ⁻³	4	0,39·10 ⁻³ ± 0,16·10 ⁻³	4	3,44·10 ⁻² ± 0,16·10 ⁻²	4	1,30·10 ⁻² ± 0,05·10 ⁻²	4

A 8 Statistische Auswertung

Tab. A 10: Endwertbestimmung und signifikante Unterschiede nach 240 h Versuchsdauer in *C. vulgaris* (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$)

Merkmal	Licht [h]	BTM [g·l ⁻¹]	Zellzahl [10 ⁷ ·ml ⁻¹]	Chl a [mg·l ⁻¹]	Chl b [mg·l ⁻¹]	Car [mg·l ⁻¹]	ph-Wert	OD ₇₅₀	ZG [μm]
FL	14	1,42 ^b ± 0,24	6,02 ^b ± 0,92	51,22 ^b ± 1,47	14,77 ^b ± 1,31	14,56 ^b ± 0,69	8,59 ^b ± 0,04	2,09 ^d ± 0,21	4,02 ^a ± 0,33
FL	20	2,32 ^{b,a} ± 0,28	8,18 ^{a,a} ± 1,12	56,28 ^{a,b} ± 5,36	16,90 ^{a,b} ± 1,36	17,51 ^{a,b} ± 3,06	9,37 ^{a,a} ± 0,16	2,83 ^{c,a} ± 0,20	3,57 ^b ± 0,30
FL	22	2,54 ^{ab} ± 0,30	8,62 ^a ± 0,64	52,07 ^b ± 3,27	16,58 ^a ± 1,11	15,67 ^b ± 1,70	9,51 ^a ± 0,14	3,01 ^b ± 0,17	4,02 ^{a, a} ± 0,28
FL	24	2,70 ^a ± 0,30	8,21 ^a ± 0,69	51,29 ^b ± 1,51	17,24 ^a ± 1,43	15,02 ^b ± 0,69	9,47 ^a ± 0,19	3,14 ^a ± 0,24	3,91 ^a ± 0,41
FL/CO ₂	14	4,69 ± 0,36	12,53 ± 2,34	40,34 ± 1,75	12,33 ± 0,95	13,25 ± 0,60	7,48 ± 0,21	4,68 ± 0,03	4,22 ± 0,35
LED	20	2,78 ^b ± 0,06	9,16 ^b ± 0,29	34,69 ^a ± 2,29	9,58 ^a ± 1,71	12,09 ^a ± 0,34	9,43 ^a ± 0,09	2,98 ^b ± 0,11	3,81 ^a ± 0,16
FL/Nitrat	24	2,12 ± 0,01	6,91 ± 0,46	87,56 ± 2,57	25,29 ± 0,69	23,65 ± 0,52	9,64 ± 0,08	3,25 ± 0,00	4,01 ± 0,15

Tab. A 11: Endwertbestimmung und signifikante Unterschiede nach 240 h Versuchsdauer in *S. obliquus* (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$)

Merkmal	Licht [h]	BTM [g·l ⁻¹]	Zellzahl [ZZ·ml ⁻¹]	Chl a [mg·l ⁻¹]	Chl b [mg·l ⁻¹]	Car [mg·l ⁻¹]	pH	OD ₇₅₀
FL	14	1,65 ^c ± 0,11	3,12 ^c ± 0,37	49,20 ^{bc} ± 7,00	15,43 ^a ± 1,06	14,00 ^c ± 2,20	8,96 ^b ± 0,37	2,21 ^d ± 0,21
FL	16	1,82 ^d ± 0,05	3,41 ^b ± 0,18	55,89 ^a ± 2,57	16,42 ^a ± 1,89	16,61 ^a ± 0,73	9,51 ^a ± 0,03	2,33 ^d ± 0,10
FL	18	1,89 ^{cd} ± 0,05	3,46 ^b ± 0,39	52,03 ^{ab} ± 2,20	14,45 ^{ab} ± 0,99	16,30 ^a ± 0,68	9,60 ^a ± 0,15	2,67 ^c ± 0,18
FL	20	2,19 ^b ± 0,16	3,83 ^a ± 0,14	47,36 ^c ± 1,49	15,54 ^{ab} ± 1,04	14,59 ^{bc} ± 0,19	9,62 ^a ± 0,20	2,77 ^{bc} ± 0,10
FL	22	2,24 ^b ± 0,13	3,45 ^b ± 0,38	48,03 ^c ± 3,43	14,58 ^{ab} ± 1,50	15,48 ^{ab} ± 1,85	9,44 ^a ± 0,08	2,91 ^b ± 0,31
FL	24	2,56 ^a ± 0,15	4,10 ^a ± 0,46	48,48 ^c ± 1,91	13,49 ^b ± 0,20	16,29 ^a ± 1,40	9,50 ^a ± 0,22	3,40 ^a ± 0,29

Tab. A 12: Regressionsanalyse für *C. vulgaris* auf Basis der Mittelwerte der Zellgehalte der analysierten Inhaltsstoffe nach 240 h, $p < 0,05$

Pearsonsche Korrelationskoeffizienten, Prob $> r $ unter $H_0: \text{Rho}=0$ Anzahl der Beobachtungen $N=4$								
	Protein	LA	ALA	β -Car	Lutein	Asta	Chl a	Chl b
Protein	1.0000	-0.4408 0.5592	0.4812 0.5188	0.9887 0.0112	0.8568 0.1431	0,9114 0,0886	0,6753 0,3246	0,4621 0,5378
LA	-0.4408 0.5592	1.0000	-0.3389 0.6611	-0.5682 0.4317	-0.1811 0.8189	-0,6820 0,3180	-0,5068 0,4932	-0,1308 0,8692
ALA	0.4812 0.5188	-0.3389 0.6611	1.0000	0.5179 0.4821	-0.0222 0.9777	0,7145 0,2855	0,9632 0,0367	0,9749 0,0251
β-Car	0.9887 0.0112	-0.5682 0.4317	0.5179 0.4821	1.0000	0.8034 0.1965	0,9538 0,0462	0,7193 0,2807	0,4667 0,5333
Lutein	0.8568 0.1431	-0.1811 0.8189	-0.0222 0.9777	0.8034 0.1965	1.0000	0,5875 0,4125	0,2011 0,7988	0,0017 0,9982
Asta	0.9114 0.0886	-0.6820 0.3180	0.7145 0.2855	0.9538 0.0462	0.5875 0.4125	1,0000	0,4661 0,0383	0,6325 0,3675
Chl a	0.6753 0.3246	-0.5068 0.4932	0.9632 0.0367	0.7193 0.2807	0.2011 0.7988	0.4661 0.0383	1,0000	0,9193 <.0001
Chl b	0.4621 0.5378	-0.1308 0.8692	0.9749 0.0251	0.4667 0.5333	0.0017 0.9982	0,6325 0,3675	0,9193 <.0001	1,0000
Licht- dauer	-0,3854 0,6146	0,8241 0,1758	-0,7779 0,2221	-0,5025 0,4975	0,0934 0,9066	-0,7304 0,2695	-0,8260 0,1740	-0,6185 0,3814
ZZ	-0.5434 0.4566	0.7157 0.2843	-0.8993 0.1007	-0.6316 0.3684	-0.0459 0.9542	-0.7305 0.2695	-0.8260 0.1740	-0.6186 0.3814

Die Ergebnisse der Zellzahl entsprechen nur für die hier verrechneten Proben, da nicht bei allen Proben Ergebnisse für die Inhaltsstoffe vorlagen. Die statistische Auswertung der Zellzahl befindet sich im Tab. A 10 und A 11.

Tab. A 13: Regressionsanalyse für den volumetrischen Gehalt der analysierten Inhaltsstoffe für *C. vulgaris* nach 240 h, $p < 0,05$

Pearsonsche Korrelationskoeffizienten, N = 4 Prob > r unter H0: Rho = 0								
	Protein	LA	ALA	β-Car	Lutein	Asta	Chl a	Chl b
Protein	1.0000 0.4612	0.5388 0.4612	-0.0055 0.9945	0.6092 0.3908	0.9687 0.0313	0.3561 0.6439	0.6611 0.3389	0.6568 0.3432
LA	0.5388 0.4612	1.0000	0.7738 0.2262	-0.3151 0.6849	0.6721 0.3279	-0.5560 0.4440	0.2699 0.7301	0.9453 0.0547
ALA	-0.0055 0.9945	0.7738 0.2262	1.0000	-0.6250 0.3750	0.0922 0.9079	-0.7076 0.2924	0.1895 0.8105	0.7502 0.2498
β-Car	0.6092 0.3908	-0.3151 0.6849	-0.6250 0.3750	1.0000	0.4172 0.5828	0.9572 0.0428	0.6397 0.3603	-0.0773 0.9227
Lutein	0.9687 0.0313	0.6721 0.3279	0.0922 0.9079	0.4172 0.5828	1.0000	0.13630 0.8637	0.4937 0.5063	0.7138 0.2862
Asta	0.3561 0.6439	-0.5560 0.4440	-0.7076 0.2924	0.9572 0.0428	0.13630 0.8637	1.0000	0.5432 0.4568	-0.3091 0.6909
Chl a	0.6611 0.3389	0.2699 0.7301	0.1895 0.8105	0.6397 0.3603	0.4937 0.5063	0.5432 0.4568	1.0000	0.5669 0.4331
Chl b	0.6568 0.3432	0.9453 0.0547	0.7502 0.2498	-0.0773 0.9227	0.7138 0.2862	-0.3091 0.6909	0.5669 0.4331	1.0000
Licht- dauer	0.7932 0.2068	0.9356 0.0644	0.5196 0.4804	0.0047 0.9953	0.89030 0.1097	-0.2775 0.7225	0.4005 0.5995	0.9215 0.0785
ZZ	0.7062 0.2938	0.9057 0.0944	0.4410 0.5590	-0.1175 0.8825	0.8532 0.1468	-0.3999 0.6001	0.1535 0.8465	0.8091 0.1909

Tab. A 14: Regressionsanalyse für *S. obliquus* auf Basis der Mittelwerte der Zellgehalte der analysierten Inhaltsstoffe nach 240 h, $p < 0,05$

Pearsonsche Korrelationskoeffizienten								
Prob > r unter H0: Rho = 0								
Anzahl der Beobachtungen								
	Protein	LA	ALA	β -Car	Lutein	Asta	Chl a	Chl b
Protein	1.0000	-0.8723	-0.0804	0.3299	0.7528	-0,3423	0,7606	0,7373
		0.0537	0.8977	0.5231	0.0841	0,5066	0,0791	0,0945
	6	5	5	6	6	6	6	6
LA	-0.8723	1.0000	0.2680	-0.9233	-0.7952	-0,0796	-0,7912	-0,7264
	0.0537		0.6629	0.0252	0.1078	0,8987	0,1109	0,1646
	5	5	5	5	5	5	5	5
ALA	-0.0804	0.2680	1.0000	-0.4224	-0.0754	-0,6649	-0,3040	-0,2523
	0.8977	0.6629		0.4787	0.9040	0,2208	0,6190	0,6822
	5	5	5	5	5	5	5	5
β-Car	0.3299	-0.9233	-0.4224	1.0000	-0.0662	0.6590	0.3924	0,6639
	0.5231	0.0252	0.4787		0.9008	0.0002	0,0429	0,1505
	6	5	5	6	6	6	6	6
Lutein	0.7528	-0.7952	-0.0754	-0.0662	1.0000	-0,2768	0,5207	0,1897
	0.0841	0.1078	0.9040	0.9008		0,5954	0,0054	0,7189
	6	5	5	6	6	6	6	6
Asta	-0.3423	-0.0796	-0.6649	0.5597	-0.2768	1,0000	0,0054	0,0696
	0.5066	0.8987	0.2208	0.2481	0.5954		0,9919	0,8957
	6	5	5	6	6	6	6	6
Chl a	0.7606	-0.7912	-0.3040	0.6708	0.1900	0,0054	1,0000	0,9831
	0.0791	0.1109	0.6190	0.1447	0.7184	0,9919		0,0004
	6	5	5	6	6	6	6	6
Chl b	0.7373	-0.7264	-0.2523	0.6639	0.1897	0,0696	0,9831	1,0000
	0.0945	0.1646	0.6822	0.1505	0.7189	0,8957	0,0004	
	6	5	5	6	6	6	6	6
Licht-dauer	-0.5126	0.6523	-0.0661	-0.6157	0.1416	0,0468	-0,8753	-0,8958
	0.2984	0.2328	0.9159	0.1932	0.7891	0,9299	0,0223	0,0157
	6	5	5	6	6	6	6	6
ZZ	-0.9141	0.7823	0.0353	-0.4835	-0.4276	0.2902	-0,9284	-0,9124
	0.0108	0.1179	0.9551	0.3312	0.3977	0,5769	0,0075	0,0112
	6	5	5	6	6	6	6	6

Tab. A 15: Regressionsanalyse für den volumetrischen Gehalt der analysierten Inhaltsstoffe für *S. obliquus* nach 240 h, $p < 0,05$

Pearsonsche Korrelationskoeffizienten								
Prob > r unter H0: Rho = 0								
Anzahl der Beobachtungen								
	Protein	LA	ALA	β -Car	Lutein	Asta	Chl a	Chl b
Protein	1.0000 0.1710 6	-0.7191 0.1710 5	-0.2772 0.6517 5	-0.2103 0.6892 6	0.5236 0.2864 6	-0.4248 0.4011 6	-0.1686 0.7495 6	-0.2585 0.6209 6
LA	-0.7191 0.1710 5	1.0000 0.1953 5	0.6922 0.1953 5	-0.5890 0.2961 5	0.7259 0.1650 5	0.4551 0.4412 5	-0.8376 0.0766 5	-0.6277 0.2569 5
ALA	-0.2772 0.6517 5	0.6922 0.1953 5	1.0000 0.3790 5	-0.5109 0.3790 5	0.5265 0.3620 5	-0.0016 0.9980 5	-0.9254 0.0242 5	-0.7020 0.1863 5
β-Car	-0.2103 0.6892 6	-0.5890 0.2961 5	-0.5109 0.3790 5	1.0000 0.5347 6	-0.3213 0.5347 6	0.5696 0.2380 6	0.6688 0.1463 6	0.6804 0.1369 6
Lutein	0.5236 0.2864 6	0.7259 0.1650 5	0.5265 0.3620 5	-0.3213 0.5347 6	1.0000 0.6521 6	0.2364 0.6521 6	-0.7248 0.1032 6	-0.6315 0.1787 6
Asta	-0.4248 0.4011 6	0.4551 0.4412 5	-0.0016 0.9980 5	0.5696 0.2380 6	0.2364 0.6521 6	1.0000 0.8452 6	0.1036 0.8452 6	0.3096 0.5505 6
Chl a	-0.1686 0.7495 6	-0.8376 0.0766 5	-0.9254 0.0242 5	0.6688 0.1463 6	-0.7248 0.1032 6	0.1036 0.8452 6	1.0000 0.8452 6	0.9013 0.0141 6
Chl b	-0.2585 0.6209 6	-0.6277 0.2569 5	-0.7020 0.1863 5	0.6804 0.1369 6	-0.6315 0.1787 6	0.3096 0.5505 6	0.9013 0.0141 6	1.0000 0.0141 6
Licht- dauer	0.1989 0.7056 6	0.8087 0.0975 5	0.4603 0.4353 5	-0.3381 0.5122 6	0.9096 0.0119 6	0.4385 0.3845 6	-0.7470 0.0879 6	-0.6695 0.1458 6
ZZ	-0.3819 0.4550 6	0.9064 0.0339 5	0.5625 0.3236 5	-0.1011 0.8489 6	0.5784 0.2291 6	0.6496 0.1627 6	-0.6223 0.1871 6	-0.4811 0.3340 6

A 9 Ermittlung der Zellgewichte

Tab. A 16: durchschnittliches Zellgewicht (n = Stichprobenzahl, ± = Standardabweichung, n. b. = nicht bestimmt)

Merkmal	Licht [h]	<i>C. vulgaris</i>	n	<i>S. obliquus</i>	n
FL	14	$2,37 \cdot 10^{-11} \pm 1,96 \cdot 10^{-12}$	6	$5,32 \cdot 10^{-11} \pm 6,41 \cdot 10^{-12}$	6
FL	16	n. b.	-	$5,34 \cdot 10^{-11} \pm 2,60 \cdot 10^{-12}$	4
FL	18	n. b.	-	$5,48 \cdot 10^{-11} \pm 5,29 \cdot 10^{-12}$	6
FL	20	$2,91 \cdot 10^{-11} \pm 3,24 \cdot 10^{-12}$	10	$5,72 \cdot 10^{-11} \pm 2,85 \cdot 10^{-12}$	4
FL	22	$2,95 \cdot 10^{-11} \pm 2,78 \cdot 10^{-12}$	12	$6,54 \cdot 10^{-11} \pm 3,62 \cdot 10^{-12}$	4
FL	24	$3,32 \cdot 10^{-11} \pm 5,62 \cdot 10^{-12}$	8	$6,31 \cdot 10^{-11} \pm 8,11 \cdot 10^{-12}$	4
FL/CO ₂	14	$3,85 \cdot 10^{-11} \pm 8,93 \cdot 10^{-12}$	3	n. b.	-
LED	20	$3,04 \cdot 10^{-11} \pm 1,44 \cdot 10^{-12}$	4	n. b.	-
FL/Nitrat	24	$3,07 \cdot 10^{-11} \pm 2,14 \cdot 10^{-12}$	2	n. b.	-

A 10 Entwicklung Chl a-Gehalt und Zellzahl in Abhängigkeit der Belichtung

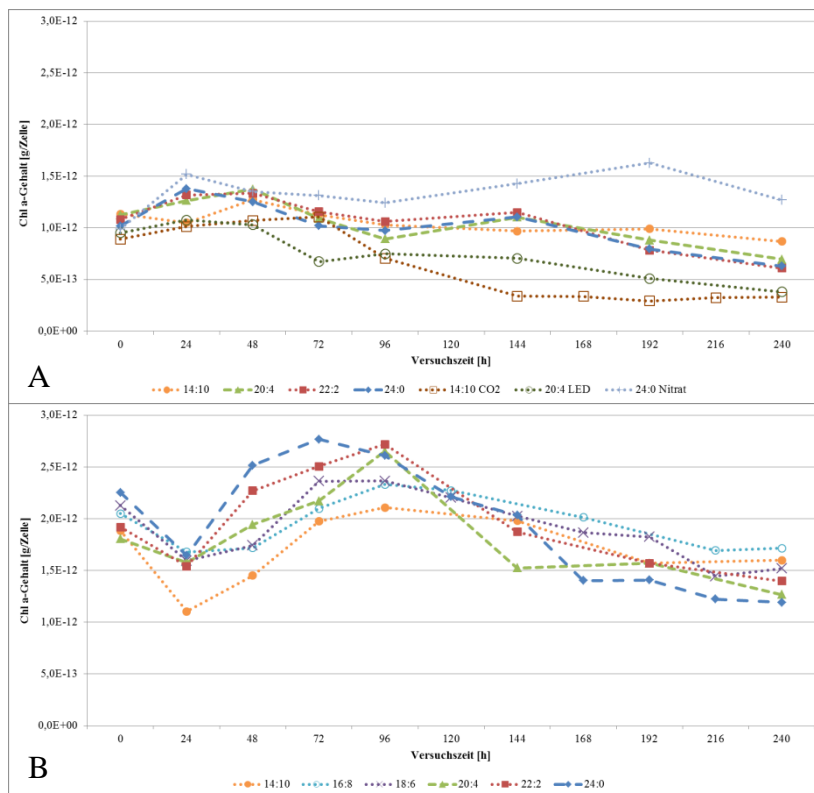


Abb. A 10A-B: Zellulärer Chl a-Gehalt in *C. vulgaris* (A) und *S. obliquus* (B) über die Versuchsdauer bei unterschiedlichen Behandlungen aus methanolischen Extrakten

A 11 Methodenvergleich zur Chlorophyllbestimmung

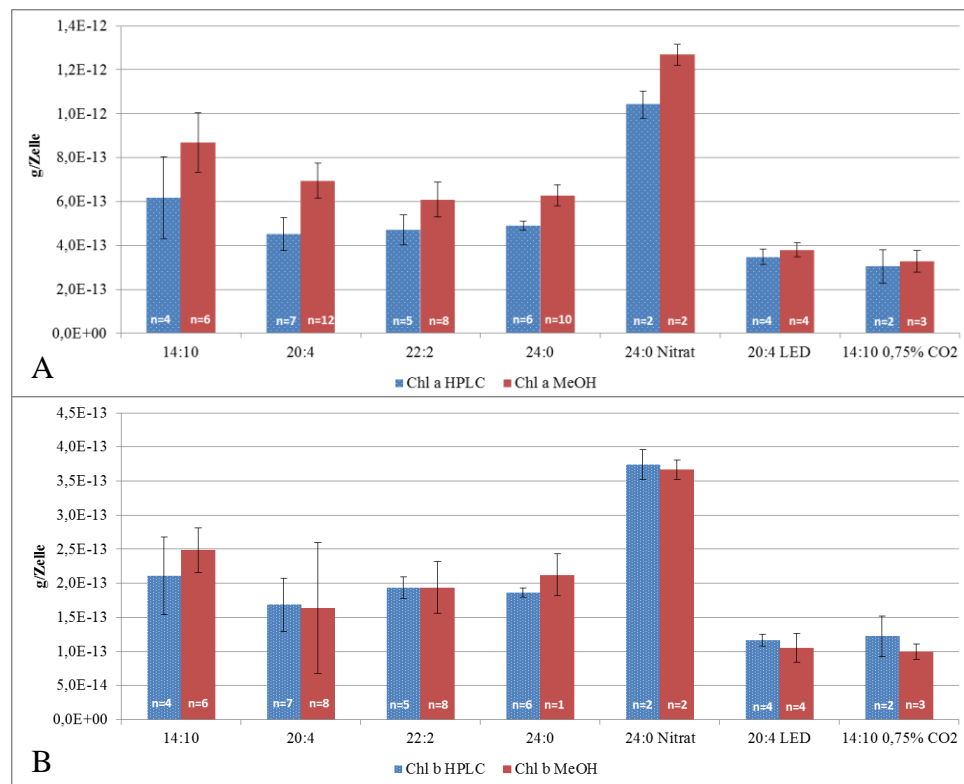


Abb. A 11A-B: Vergleich Chl a (A)- und Chl b (B)-Zellgehalte aus der Bestimmung gefriergetrockneter Proben mittels HPLC mit den Ergebnisse aus methanolischen Extrakten von *C. vulgaris* (n = Stichprobengröße, Balken stellen Standardabweichung dar)

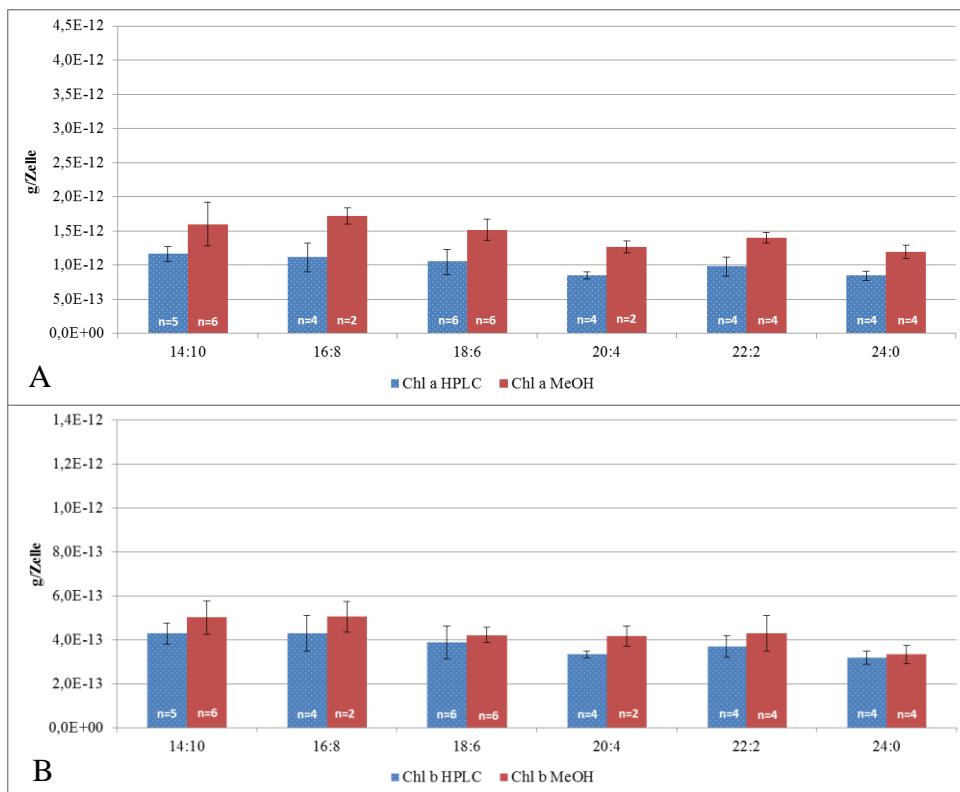


Abb. A 12A-B: Vergleich Chl a (A)- und Chl b (B)-Zellgehalte aus der Bestimmung gefriergetrockneter Proben mittels HPLC mit den Ergebnisse aus methanolischen Extrakten von *S. obliquus* (n = Stichprobengröße, Balken stellen Standardabweichung dar)

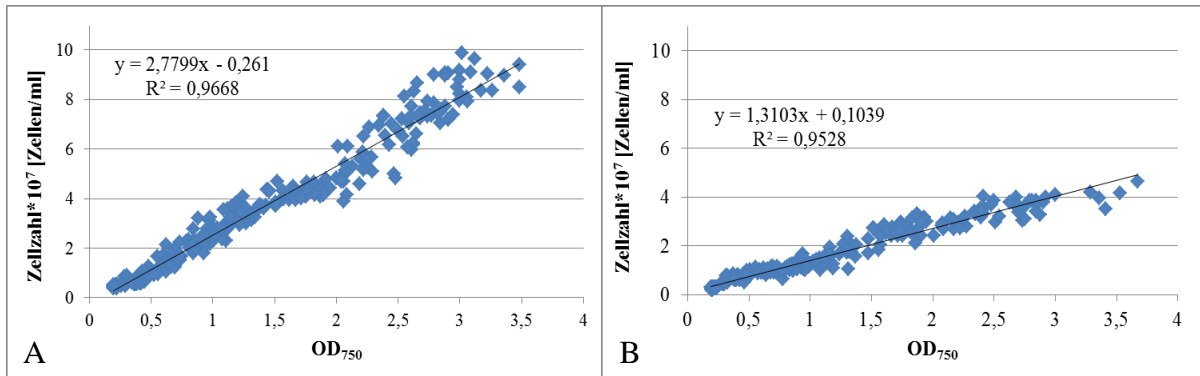
A 12 Abhängigkeit zwischen der OD₇₅₀ und der Zellzahl

Abb. A 13A-B: Gegenüberstellung der OD₇₅₀ zur Zellzahl bei *C. vulgaris* (A) und *S. obliquus* (B); Werte aus allen Versuchen

Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Sohra, den 9.4.18

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Familienname: Claudia Scharff
 Geburtsdatum: 30. Juni 1984
 Geburtsort: Karl-Marx-Stadt jetzt Chemnitz
 Kinder: Hannes Scharff (2015)
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1995 – 2003 Georgius-Agricola-Gymnasium Chemnitz
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
 Leistungskurse: Deutsch, Biologie

Studium

2003 - 2007 Umwelttechnik/Biotechnologie an der FH Mittweida
 Abschluss: Diplom-Ingenieur (Dipl.-Ing. FH)
 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Verwertung von verschiedenen C-Quellen von Polyphosphatakkumulierenden Organismen (PAO)“ an der TU Dresden, Lehrstuhl für angewandte Mikrobiologie

2007 - 2010 Pharmabiotechnologie an der FH Jena
 Abschluss: Master of Science (M. Sc.)
 Masterarbeit: „Untersuchungen zum Einfluss von UV-B Bestrahlung auf die Zusammensetzung gesundheitsrelevanter Inhaltsstoffe in *Eruca sativa* Mill.“ an der HTW Dresden, Fakultät Landbau/Landespflege

2012 – 2017 Promotionsstudium im Fachbereich Agrarwissenschaften an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III an der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg

Berufstätigkeit

September 2009 – Oktober 2011 HTW Dresden, wissenschaftliche Mitarbeiterin
 Forschung im Projekt: „Entwicklung innovativer Lampen zur Ertrags- und Qualitätssteigerung von bedeutenden Kulturen im Gemüse- und Zierpflanzenbau“

November 2011 – Dezember 2011 HTW Dresden, wissenschaftliche Mitarbeiterin
 Forschung im Projekt: „Resource-Saving Greenhouse“

Januar 2012 – Februar 2014 HTW Dresden, wissenschaftliche Mitarbeiterin
 Forschung im Projekt: „Nutzung einer Mikrowellenmodifikation an Algen für neue Applikationsfelder; Untersuchung der an Algen ablaufenden Mechanismen bei einer Mikrowellenbehandlung“

März 2014 – Juni 2014	HTW Dresden, wissenschaftliche Mitarbeiterin Forschung im Projekt: „Stimulierung von internen Anregungsprozessen in Algen durch eine zusätzliche kontinuierliche oder gepulste UV-Strahlung; Untersuchung der internen Prozesse in Algenzellen bei zusätzlicher UV-Strahlung“
Juni 2014 – Februar 2017	Zentrum für angewandte Forschung e.V., wissenschaftliche Mitarbeiterin Forschung im Projekt: „Kompakter Reaktor für die Behandlung von flüssigen, biologischen Medien; Untersuchung der internen Prozesse und Abhängigkeiten“
April 2015 – April 2016	Mutterschutz und Elternzeit