

Entwicklung und Evaluierung neuer Bioreaktorkonzepte für phototrophe Mikroorganismen

Der Fakultät Maschinenwesen

der

Technischen Universität Dresden

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegte Dissertation

Felix Krujatz MSc.

geboren am 15.07.1985 in Bautzen

Tag der Einreichung: 11.03.2016

Tag der Verteidigung: 20.06.2016

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Bley (TU Dresden)

Prof. Dr. rer. nat. habil. Rainer Krull (TU Braunschweig)

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. habil. Rüdiger Lange

„Lasst uns in dieser turbulenten Zeit auf die Werte besinnen, die wirklich wichtig sind: Nächstenliebe und Menschlichkeit“

Kurzzusammenfassung

Entwicklung und Evaluierung neuer Bioreaktorkonzepte für phototrophe Mikroorganismen

Krujatz, F. - Dresden: Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen, Dissertation 2016, 124 Seiten, 64 Abbildungen, 9 Tabellen, 5 Anhänge

Die Photobiotechnologie nutzt photosynthesegetriebene Bioprozesse zur nachhaltigen Synthese von Wertstoffen und Energieträgern. Diese Bioprozesse rücken vor allem durch die stoffliche Nutzung von CO₂ als Kohlenstoff- und Licht als regenerative Energiequelle in den Fokus von Forschung und Entwicklung. Trotz der enormen Vielfalt von geschätzten 500.000 Algenspezies werden zurzeit nur ca. 15 Mikro- und 220 Makroalgen technisch genutzt. Dieser Umstand ist u.a. dem geringen Prozessverständnis und den spezifischen Anforderungen der photobiotechnologischen Prozesse an die technischen Systeme geschuldet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kultivierungssysteme für die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen *Rhodobacter sphaeroides* DSM158, *Chlamydomonas reinhardtii* 11.32b und *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 entwickelt und evaluiert.

Die photofermentative Wasserstoffproduktion mittels *R. sphaeroides* DSM158 erfolgte in einem eigens dafür konzipierten gerührten Halogen-Photobioreaktor durchgeführt. Im Satzbetrieb wurde der Einfluss des volumetrischen Leistungseintrages (P_0/V_L) und der mittlere Bestrahlungsstärke (I_0) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *R. sphaeroides* DSM158 bei einer durchschnittlichen I_0 von 2250 W m⁻² und einem P_0/V_L von 0,55 kW m⁻³ im Satzbetrieb eine maximale Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}) von 195 mL L⁻¹ h⁻¹ erzielt. Das Reaktorsystem wurde mittels optischer *Ray Tracing* Simulation, einer empirischer Simulation der Strahlungsverteilung und *Computational Fluid Dynamics* (CFD) charakterisiert, um die Prozessbedingungen für *R. sphaeroides* DSM158 zu analysieren. Der photofermentative Prozess wurde in ein kontinuierliches Verfahren überführt, welches unter optimalen Bedingungen von $I_0 = 2250$ W m⁻², einer Durchflussrate von 0,096 h⁻¹ und einem C:N-Verhältnis von ca. 22,5 eine r_{H_2} von 170,5 mL L⁻¹ h⁻¹ lieferte.

Für Mikroalgen wurden Kultivierungssysteme für Suspensions- und immobilisierte Kulturen entwickelt und charakterisiert. Zur Kultivierung immobilisierter Mikroalgen wurde die Methode des *Green Bioprinting* etabliert, die auf der 3D-Bioprinting Technologie des *Tissue Engineering* beruht. Bei diesem Verfahren werden Algenzellen über einen Extrusionsprozess in ein strukturiertes Hydrogel eingebettet. In vergleichenden Studien zum Wachstum in Suspensionskulturen konnte gezeigt werden, dass die Hydrogelumgebung ideale Bedingungen für

das photoautotrophe Wachstum und die Zellviabilität von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 liefert.

Der MicroLED-Bioreaktor bezeichnet ein miniaturisiertes Flat-Panel-Airlift (FPA)-Bioreaktorsystem mit 15 mL Arbeitsvolumen und nichtinvasiver optischer Prozessüberwachung in Bezug auf zellspezifische Parameter (Zelldichte und Fluoreszenz) und Suspensionsparameter (pH, dO_2 und dCO_2). Hydrodynamische Untersuchungen der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer zeigten vergleichbare und damit skalierbare Eigenschaften zu Labor- und Produktions-FPA-Bioreaktoren. Im Zuge des MicroLED-Bioreaktors wurden erstmals organische Leuchtdioden für den Einsatz in Photobioreaktoren verwendet und charakterisiert. Die geometrisch komplexen Bioreaktorkomponenten wurden mittels additiver Fertigungstechnologien aus Polyamid hergestellt und erlauben die Integration der optischen Elemente zur Überwachung des Bioprozesses in Echtzeit.

Abstract

Design and evaluation of new bioreactor concepts for phototrophic microorganisms

Krujatz, F. - Dresden: Technische Universität Dresden, Faculty of Mechanical Science and Engineering, Dissertation 2016, 124 pages, 64 figures, 9 tables, 5 appendices

Photobiotechnology enables the development of bioprocesses for the sustainable synthesis of chemicals and energies. Due to their ability to use CO₂ as the sole source of carbon and light as a regenerative energy source photosynthesis-driven bioprocesses got into the spotlight of research and development within the last decades. Despite the great potential of estimated 500,000 algal species there are currently only ca. 15 microalgae and 220 macroalgae which are industrially used. This fact is also due to the low process understanding and the specific requirements of photobiotechnological processes.

In the present work, new culture systems for the photosynthetic non-sulfur purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158 and the widely-used microalgae strains *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* 11.32b UTEX1230 were developed and evaluated.

The photofermentative hydrogen production by *R. sphaeroides* DSM158 was carried out in a stirred halogen-photobioreactor designed in-house. The influence of the volumetric power input (P_0/V_L) and the average irradiance (I_0) on the hydrogen production rate (r_{H_2}) were investigated in batch-mode operation. It was shown that *R. sphaeroides* DSM158 attained a maximum r_{H_2} of 195 mL L⁻¹ h⁻¹ at an I_0 of 2,250 W m⁻² and a P_0/V_L of 0.55 kW m⁻³. The irradiated bioreactor system was characterized by optical ray tracing simulation, empirical simulation of radiation distribution, and computational fluid dynamics (CFD) to analyze the process conditions for *R. sphaeroides* DSM158. The process was transferred from batch-mode operation to a continuously-operated photofermentation, which achieved an r_{H_2} of 170.5 mL L⁻¹ h⁻¹ under optimal process conditions of 2,250 W m⁻², a dilution rate of 0.096 h⁻¹ and a C:N ratio of ca. 22.5.

For microalgae cultivation systems for suspension and immobilized cultures were developed and evaluated.

Immobilization of microalgal cells in structural-organized hydrogels was achieved by using a method that was called *Green Bioprinting*. This Rapid Prototyping technology was derived from the 3D-bioprinting approaches that are used in field of tissue engineering. In comparative studies with suspension cultures it could be shown that the hydrogel environment provided excellent conditions for photoautotrophic growth and cellular viability of *C. reinhardtii* 11.32b and *C. sorokiniana* UTEX1230.

The MicroOLED-bioreactor was designed as miniaturized flat-panel-airlift (FPA)-bioreactor with a working volume of 15 mL. The FPA-cultivation system was equipped with a non-invasive optical process monitoring with respect to cell-specific parameters (cell density and fluorescence) and suspension parameters (pH, dO_2 and dCO_2). The hydrodynamic properties of the miniaturized FPA-chamber are comparable to lab-scale and production FPA-bioreactors. In this context organic light emitting diodes were used and characterized for the application in photobioreactors for the first time. The geometrically complex bioreactor components which allow the integration of the optical components for monitoring the bioprocess in real-time, have been produced by additive manufacturing technology from polyamide.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILB) der TU Dresden (seit 01.07.2016 Institut für Naturstofftechnik) unter der fachlichen Leitung von Herrn Prof. Thomas Bley. Prof. Bley gab mir die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl sehr wertvolle Erfahrungen zu sammeln und viele forschungsbegeisterte Menschen kennenzulernen. Er half mir, mein wissenschaftliches Profil zu definieren. Ich bedanke mich vor allem für die Flexibilität und das damit verbundene Vertrauen, das mir Prof. Bley während meiner Promotionszeit ohne jegliche Beanstandung entgegengebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Rainer Krull, Leiter des Instituts für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig, der sich für die Übernahme des Zweitgutachtens bereit erklärt hat. Während meiner Zeit als Student der Biotechnologie an der TU Braunschweig war das Institut für Bioverfahrenstechnik wie eine zweite Familie. Deshalb wird eine nachhaltige innere Verbindung zu dieser prägenden Zeit immer bestehen bleiben.

Während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am ILB habe ich mich mit einer breiten Palette an wissenschaftlichen Aufgabenstellungen und mindestens ebenso vielen verschiedenen (Mikro-) Organismen (Hefen, Pflanzenzellkulturen, phototrophe Bakterien und Mikroalgen) befasst. Diese Vielfalt spiegelt die Tatsache wider, dass ich beinahe allen Arbeitsgruppen am ILB durchlaufen haben. Deswegen danke ich alle Arbeitsgruppenleitern, angefangen bei Dr.-Ing. Juliane Steingroewer, die mir 2011 die Gelegenheit gab, in Ihrer Arbeitsgruppe den Schritt an die TU Dresden zu gehen. Darüber hinaus danke ich PD Christian Löser, der immer ein offenes Ohr und kreative Lösungen für bioprozesstechnische Fragestellungen hatte. Ebenso danke ich Fr. PD Elke Boschke, die mir in schwierigen Zeiten der Projektbeantragung, die Möglichkeit gab, in Ihrer Arbeitsgruppe eine Zwischenfinanzierung zu erhalten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr.-Ing. Jost Weber, der mich den Großteil meiner Promotionszeit an der TU Dresden als Schreibtischnachbar, AG-Leiter, Kritiker und Mentor begleitet hat und von dem ich eine Menge gelernt habe. Dr.-Ing. Weber hat es stets geschafft, mir eine konstruktive Basis zu sein, wofür ich ihm sehr dankbar bin. In vielen Brainstormings haben wir an neuen Projektideen gefeilt, den ein oder anderen Projektantrag gemeinsam erarbeitet, einige Dienstreisen im In- und Ausland gemeinsam bestritten und Höhen und Tiefen der Wissenschaft durchlebt.

Eine erfolgreiche Forschungsarbeit ist nur mit einem kollegialen und funktionierenden Kollektivteam möglich. Mein Dank gilt demnach allen Mitarbeitern des ILB, insbesondere Karsten, der mit mir eine gemeinsame „Wasserstoffzeit“ durchlebt hat und stets für Rat und Tat zu Seite stand. Außerdem natürlich allen Photo- und Pflanzenforschern, d.h. insbesondere Lisa,

Katja, Chrissi und Caro und natürlich den guten Seelen des Labors Eva, Kristin und Madlen. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des ILB für das gute Arbeitsklima.

Zahlreiche studentische Arbeiten bilden die Grundlage meiner Dissertation. Deswegen gilt mein weiterer Dank den Diplomanden/innen Bastian, Paul, Tobias, Rico und Katharina sowie den Belegstudenten Jing, Julius, Carl, Laura, Christian und Julien. Ohne die tatkräftige Unterstützung dieser Studenten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Eine der wichtigsten Fähigkeiten, die ich während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am ILB gelernt habe, ist die interdisziplinäre Arbeit. Deswegen danke ich ebenfalls allen Projektpartnern, die mich im Verlauf der einzelnen Projekte unterstützt haben. Dazu gehören vor allem Dr. Karsten Fehse und Matthias Jähnel (Fraunhofer FEP), die gemeinsam mit mir zwei erfolgreiche Projekte gestaltet, beantragt und bearbeitet haben. Des Weiteren danke ich dem Team der Contronix GmbH (Christoph Gommel, Frank Lindner und Carsten Schurig), die mir immer wieder wichtige und spannende Impulse für die Entwicklung des OLED-Bioreaktors gegeben haben.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Team von Prof. Michael Gelinsky (Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenks- und Weichgewebeforschung), namentlich v.a. Dr. Anja Lode und Sophie Brüggemeier für die gemeinsame Arbeit im Bereich des 3D-Bioprintings.

Die wichtigste Person, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, ist meine Frau Sandra, die mir in den entscheidenden Phasen den Rücken für die Erarbeitung dieser Arbeit frei gehalten hat und sich mit vollem Herzen der Betreuung unserer drei Kinder aufopferte. Mein akademischer Weg wäre nicht ohne die Unterstützung meiner Eltern und Schwiegereltern möglich gewesen. Deswegen danke ich auch Ihnen von Herzen für die tatkräftige Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Licht - Definitionen und assoziierte Größen.....	3
1.2	Biologische Aspekte der Photobiotechnologie - Photosynthese.....	5
1.2.1	Oxygene Photosynthese.....	8
1.2.2	Anoxygene Photosynthese.....	9
1.3	Technische Aspekte der Photobiotechnologie - Photobioreaktoren	
1.3.1	Screeningmaßstab (0,01 L - 0,5 L).....	11
1.3.2	Labormaßstab (0,5 L - 5,0 L).....	13
1.3.3	Produktionsmaßstab (> 50 L).....	14
1.4	Problemstellung und Herausforderungen.....	16
2.	Prozessentwicklung zur photofermentativen Produktion von Wasserstoffgas mittels <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM158	
2.1	Einleitung	
2.1.1	Photobiotechnologische Wasserstoffproduktion.....	17
2.1.2	Kultivierungsbedingungen für PNS-Bakterien mit dem Ziel der Wasserstoffproduktion.....	19
2.1.3	Prozessführung für die anaerobe Kultivierung von PNS-Bakterien.....	20
2.1.4	Ermittlung der zellulären Lichtverfügbarkeit in Photobioreaktoren (PBR)...	20
2.2	Material und Methoden	
2.2.1	Mikroorganismus, Vorkultur und Inokulation.....	21
2.2.2	Aufbau des Halogen-Photobioreaktors.....	22
2.2.3	Versuche im Satzbetrieb.....	22
2.2.4	Optimierung des volumetrischen Leistungseintrages P_0/V_L [kW m^{-3}] und der mittleren Bestrahlungsstärke I_0 [W m^{-2}] im Satzbetrieb.....	25
2.2.5	Bestimmung der Rührer-Reynolds-Zahl (Re_R).....	26
2.2.6	Versuche im kontinuierlichen Betrieb (Chemostat).....	26
2.2.7	Kontinuierliche Kultivierung bei variierender Durchflussrate D [h^{-1}] und Rührer-Reynolds-Zahl Re_R	27
2.2.8	Bestimmung des Wasserstoffausbeute-Koeffizienten Y_{H_2}	27
2.2.9	Offline-Analytik.....	27
2.2.10	Aufnahme von Ganzzellabsorptionsspektren.....	30
2.2.11	Aufnahme von Emissionsspektren und Intensitäten.....	30
2.2.12	ZEMAX - Simulation.....	30
2.2.13	Empirische Intensitätsmodellierung für ein zylindrisches Reaktorgefäß....	31

2.2.14	Experimentelle Bestimmung der empirischen Parameter ε_m, K_c, K_l	33
2.2.15	COMSOL Multiphysics - <i>Computational Fluid Dynamics</i> (CFD).....	34
2.3	Ergebnisse und Diskussion	
2.3.1	Optimierung des volumetrischen Leistungseintrages P_0/V_L [kW m^{-3}] und der mittleren Bestrahlungsstärke I_0 [W m^{-2}] im Satzbetrieb.....	36
2.3.2	Überführung der optimierten Parameter in ein kontinuierliches Verfahren.....	45
2.3.3	X-D-Diagramm.....	46
2.3.4	Variation von Re_R [-] bei konstanter Durchflussrate D [h^{-1}].....	48
2.3.5	Optische <i>Ray Tracing</i> Simulation.....	50
2.3.6	Empirische Simulation der Strahlungsverteilung im Halogen-Photobioreaktor.....	52
2.3.7	Charakterisierung der Strömungszustände mittels <i>Computational Fluid Dynamics</i> (CFD).....	53
2.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	56
<hr/>		
3.	<i>Green Bioprinting</i> - Mikroalgenkultivierung und Biomonitoring in 3D-geplotteten Hydrogelen	
3.1	Einleitung	
3.1.1	Hydrogele - Aufbau, Eigenschaften und Verwendung.....	57
3.1.2	Kultivierungsumgebungen und Biomonitoring von Mikroalgen-Populationen.....	59
3.1.3	Immobilisierung von Mikroalgen und deren Anwendung.....	61
3.2	Material und Methoden	
3.2.1	Mikroalgen - Stämme und Kultivierung.....	62
3.2.2	Suspensionskulturen - Einfluss der Temperatur und Beleuchtungszyklen	63
3.2.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Viabilität von suspendierten Mikroalgenkulturen.....	63
3.2.4	Immobilisierung von Mikroalgen in 3D-geplotteten Hydrogelen.....	64
3.2.5	Zellzahlbestimmung von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgen.....	65
3.2.6	Ermittlung der Viabilität von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgen.....	66
3.3	Ergebnisse und Diskussion	
3.3.1	Photosynthetisches Wachstum von Mikroalgen in strukturierten Hydrogelen.....	68
3.3.2	Validierung der Viabilitätsbestimmung von Mikroalgen-Suspensionskulturen mittels DiBAC ₃ (4)-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse.....	70
3.3.3	Einfluss von Temperatur und Beleuchtungszyklen auf die Viabilität von Mikroalgen Suspensionskulturen.....	74
3.3.4	Einfluss von Temperatur und Beleuchtungszyklen auf das Wachstum und die Viabilität von in Hydrogelen immobilisierten Mikroalgenkulturen.....	79
3.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	84

4.	Entwicklung eines miniaturisierten Laborkultivierungssystems für Mikroalgen mit optischem Prozessmonitoring (MicroLED-Bioreaktor)	
4.1	Einleitung	
4.1.1	Lichttechnologien in der Photobiotechnologie.....	86
4.1.2	Organische Elektronik: OLED-Technologie.....	87
4.1.3	Materialien und Fertigungstechnologien.....	89
4.1.4	Übersicht über additive Fertigungsverfahren.....	90
4.1.5	Zielstellung - Entwicklung eines miniaturisierten OLED-basierten Laborkultivierungssystems mit nicht-invasiven optischen Prozessmonitoring...	93
4.2	Material und Methoden	
4.2.1	Mikroorganismus, Medium und Vorkultur.....	94
4.2.2	Aufbau des miniaturisierten Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktors.....	95
	(FPA-PBR)	
4.2.2.1	FPA-PBR Basis.....	95
4.2.2.2	FPA-Kultivierungskammer.....	95
4.2.2.3	OLED-Module und optische Sensoren.....	97
4.2.2.4	Prozessleitsoftware OLEmibi.....	99
4.2.2.5	Sterilisation, Inokulation, Temperierung, Sensorkalibrierung und Kultivierung.....	100
4.2.2.6	Bestimmung der Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] und Emissionsspektren.....	100
4.2.3	Charakterisierung der hydrodynamischen Parameter	
4.2.3.1	Bestimmung des volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten $k_L a$ [h^{-1}].....	101
4.2.3.2	Bestimmung des Gas hold-up ϵ_G , der Mischzeit t_m und der Verdunstungsverlute.....	102
4.3	Ergebnisse und Diskussion	
4.3.1	Vergleich der spektralen Eigenschaften von OLED und LED.....	103
4.3.2	Bestimmung der OLED-Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$].....	104
4.3.3	Hydrodynamische Charakterisierung der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer.....	106
4.3.4	Nichtinvasives optisches Prozessmonitoring der Suspensionsdynamik...	109
4.3.5	Anwendungsbeispiel I: Monitoring der Stoffwechselaktivität von Mikroalgen.....	111
4.3.6	Anwendungsbeispiel II: Optimierung der Prozessbedingungen unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen.....	115
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	119

5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	120
<hr/>		
6.	Anhang	
A1	Literaturverzeichnis.....	A-1
A2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	A-13
A3	Thesen zur Dissertation.....	A-19
A4	Verzeichnis eigener Veröffentlichungen.....	A-21
A5	Selbstständigkeitserklärung.....	A-25

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ATP	Adenosintriphosphat
CAD	<i>Computer-aided design</i> (rechnerunterstütztes Konstruieren)
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i>
DiBAC ₄ (3)	bis-(1,3-dibarbituric acid)-trimethine oxonol
FL	Fluoreszenzkanal
FPA	Flat-Panel-Airlift
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
HS	<i>High-Salt</i>
LED	Lichtemittierende Diode
LHC	<i>Light-harvesting complex</i> (Lichtsammelkomplex)
OLED	Organische Lichtemittierende Diode
PAR	<i>Photosynthetic active radiation</i> (Photosynthetisch aktive Strahlung)
PBR	Photobioreaktor
PFD	Photonenflussdichte
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNS	<i>Purple non-sulfur</i> (Nichtschwefelpurpurbakterium)
POF	Polymeroptische Faser
PS	Photosystem
RC	<i>Reaction center</i> (Reaktionszentrum)
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
TP	Tris-Phosphat

Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung	Einheit
BTM	Biotrockenmassekonzentration	g L^{-1}
D	Durchflussrate	h^{-1}
dO_2	Konzentration Sauerstoff gelöst	mg L^{-1}
dCO_2	Konzentration Kohlenstoffdioxid gelöst	mg L^{-1}
F	Feedrate	L h^{-1}
I_0	Mittlere Bestrahlungs-/Beleuchtungsstärke	W m^{-2} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_{ave}	Simulierte mittlere Bestrahlungsstärke	W m^{-2}
k	Turbulente kinetische Energie	$\text{m}^2 \text{s}^{-2}$
k_{La}	Volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient	h^{-1}
l	Lichtpfadlänge	cm
N	Rührerdrehzahl	s^{-1}
N_0	Newton-Zahl	[-]
OD	Optische Dichte	[-]
P_{BTM}	Biomassebezogene Produktivität	$\text{mL g}^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$
PFD	Photonenflussdichte	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
p_{gas}	CO_2 -Partialdruck	atm
P_0/V_L	Volumenbezogener Leistungseintrag	kW m^{-3}
Re_R	Rührer-Reynolds-Zahl	[-]
r_{H_2}	Wasserstoffproduktionsrate	$\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_{ev}	Verdunstungsrate	$\% \text{d}^{-1}$
t_m	Mischzeit	s
u_G	Gasleerrohrgeschwindigkeit	m h^{-1}
V	Arbeitsvolumen	L
v	Fluidgeschwindigkeit	m s^{-1}

$V_{\max r}$	Max. radiale Fluidgeschwindigkeit	m s^{-1}
Y_{H_2}	Wasserstoffausbeutekoeffizient	%
z	Weglänge	cm

Griechische Symbole

Abkürzung	Bezeichnung	Einheit
ε	Dissipationsrate	$\text{m}^2 \text{s}^{-3}$
ε_{G}	Gas hold-up	[-]
η	Dynamische Viskosität	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
ρ	Dichte	kg m^{-3}
ν	Kinematische Viskosität	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
μ_{f}	Turbulente Viskosität	N s m^{-2}
μ	Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}, \text{d}^{-1}$

Konstanten

Abkürzung	Verwendung	Einheit
ε_{m}	Empirische Strahlungsintensität	[-]
K_{c}	Empirische Strahlungsintensität	g L^{-1}
K_{l}	Empirische Strahlungsintensität	m
C_{μ}	k- ε Turbulenzmodell	[-]
σ_{k}	k- ε Turbulenzmodell	[-]
σ_{k}	k- ε Turbulenzmodell	[-]
$C_{\varepsilon 1}$	k- ε Turbulenzmodell	[-]
$C_{\varepsilon 2}$	k- ε Turbulenzmodell	[-]
k_{c}	Lambert-Beer-Gesetz	$\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$
K_{H}	Henry-Gesetz	$\text{mol}_{\text{gas}} \text{L}^{-1} \text{atm}^{-1}$

1. Einleitung

Die wissensbasierte Bioökonomie hat sich sowohl in der akademischen Forschung als auch in der Industrie zu einem zentralen Leitthema entwickelt. Die fossilen Ressourcen Kohle, Erdöl und Erdgas haben das Wirtschaftsbild der vergangenen 100 Jahre nachhaltig geprägt. Sie waren ein wichtiger Grund für den Reichtum und Lebensstandard der Industriestaaten; allerdings auch für die Rohstoffausbeutung der Entwicklungsländer. Unter Berücksichtigung der Verknappung der fossilen Rohstoffe, der klimatischen Entwicklung und der wachsenden Weltbevölkerung ist ein Umdenken im Umgang mit den uns zur Verfügung stehenden Ressourcen unumgänglich.

Im Jahr 2005 stellte der EU-Forschungskommissar Potocnik erstmals das Konzept einer wissensbasierten Bioökonomie vor, eine Wirtschaftsform, die durch Nachhaltigkeit und Ressourceneffizienz geprägt ist [1]. Ein grenzübergreifender Einklang von Ökonomie und Ökologie und ein nachhaltiges Wirtschaftswachstum sind seitdem die Kernthemen zahlreicher nationaler und internationaler Forschungsstrategien und Aktionspläne. Die wichtigsten nationalen Programme im Forschungssektor sind dabei die Nationale Forschungsstrategie Bioökonomie 2030, der Nationale Biomasseaktionsplan, die Nationale Nachhaltigkeitsstrategie und der Aktionsplan zur Nutzung nachwachsender Rohstoffe.

Die Solarenergie zählt zu den wichtigsten regenerativen Energiequellen. Zahlreiche Technologien zur Nutzung dieser Energiequelle sind Gegenstand aktueller Forschung und Entwicklung. Dabei werden Verfahren zur direkten und indirekten Nutzung der Sonnenenergie unterschieden [2]. Direkte Verfahren sehen eine sofortige Umwandlung in Wärme (Solarthermie) oder elektrische Energie (Solarzellen) vor, wobei indirekte Verfahren die sekundäre Verwertung von Biomasse, die durch Photosynthese erzeugt wurde, zu Grunde legen. Besondere Bedeutung der indirekten Nutzung von Solarenergie gewinnt zunehmend die Produktion von Energiepflanzen, die vor allem für die nachhaltige Herstellung von Biokraftstoffen eingesetzt werden. Allerdings ist die öffentliche Akzeptanz von Energiepflanzen gering, da die genutzte Agrarfläche nicht für den Anbau von Nutzpflanzen zur Verfügung steht (Tank vs. Teller-Diskussion).

Die Photobiotechnologie/Algenbiotechnologie ist eine sehr junge Disziplin im Bereich der Biotechnologie und befasst sich mit der mikrobiellen Nutzung von Lichtenergie durch phototrophe Bioprozesse, die zukünftig einen wichtigen Beitrag zur Etablierung nachhaltiger industrieller Energie- und Syntheseprozesse liefern. Phototrophe Organismen, z.B. Algen, Cyano- oder Purpurbakterien, sind in der Lage, Licht als einzige Energiequelle zum Aufbau hochwertiger Produkte, u.a. Farbstoffe, Biokraftstoffe oder pharmazeutischer Wirkstoffe zu nutzen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit wichtigsten Produkte phototropher Mikroorganismen.

Photobiotechnologische Produkte werden entsprechend ihres Marktwertes den Kategorien „*high-value*“ oder „*low-value*“ zugeordnet. „*Low-value*“-Produkte umfassen vor allem die Biomasse, die zur Weiterverarbeitung in der Nahrungsmittel- und Biotreibstoffindustrie erzeugt wird. Die Anzucht der phototrophen Organismen erfolgt dabei vorwiegend in offenen Systemen, z.B. *Raceway*-Ponds oder künstlich angelegten Seen, die der natürlichen Solarstrahlung ausgesetzt sind.

Tabelle 1: Übersicht über die zurzeit wichtigsten Produkte phototropher Organismen und deren Marktpotential, erweitert aus [3].

	Produkt	US \$ Kg⁻¹	Marktgröße US \$ *10⁶
Biomasse	Health Food	10-80	1.100
	Functional Food	25-52	Wachsend
	Nahrungsergänzungsmittel	10-130	Stark wachsend
	Aquakultur	50-150	Stark wachsend
	Bodenaufbereitung	>10	Vielversprechend
Pigmente	Astaxanthin	2.500-8.000	>250
	Beta-Carotine	>750	>25
Antioxidantien	Superoxid dismutase	>1.000	Vielversprechend
	Tocopherol	30-40	Vielversprechend
	Algenöl	20-50	12-20
	Arachidonsäure	48-185	50
	Eicosapentaensäure (EPA)	35-70	300
	Docosahexaensäure (DHA)	50-200	250
	Ungesättigte Fettsäuren	30-80	10
Weitere Produkte	Toxine	-	1-3
	Isotope	-	>5
Biokraftstoffe	Wasserstoff		Forschung und Entwicklung
	Biodiesel		Forschung und Entwicklung
	Jet Fuel		Forschung und Entwicklung

Als „*high-value*“-Produkte werden vor allem intrazelluläre Verbindungen bezeichnet, die für die pharmazeutische und analytische Industrie interessant sind, z.B. Pigmente, Antioxidantien oder ungesättigte Fettsäuren. Der Marktwert des Produktes bestimmt zudem den technischen Aufwand, der für die Produktion und zum Erzielen konstant hoher Produktqualität und –quantität eingesetzt wird. „*High-value*“ Produkte werden deshalb in geschlossenen Photobioreaktorsystemen mit der für Bioreaktoren standardisierten Prozessüberwachung und -steuerung synthetisiert. Die Kultivierung in Photobioreaktoren bietet den Vorteil, dass keine Agrarfläche benötigt wird und die Produkte somit nicht in der „Tank vs. Teller“-Diskussion stehen, wie es bei der Anzucht von Energiepflanzen der Fall ist. Weitere Vor- und Nachteile unterschiedlicher Photobioreaktorsysteme werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert und diskutiert.

1.1 Licht - Definitionen und assoziierte Größen

Licht stellt die einzige Energiequelle für photoautotrophes Wachstum und Produktbildung dar. Aus diesem Grund ist die Beschreibung der Lichteigenschaften, die Quantifizierung und Bilanzierung essentiell für die Bewertung photobiotechnologischer Prozesse.

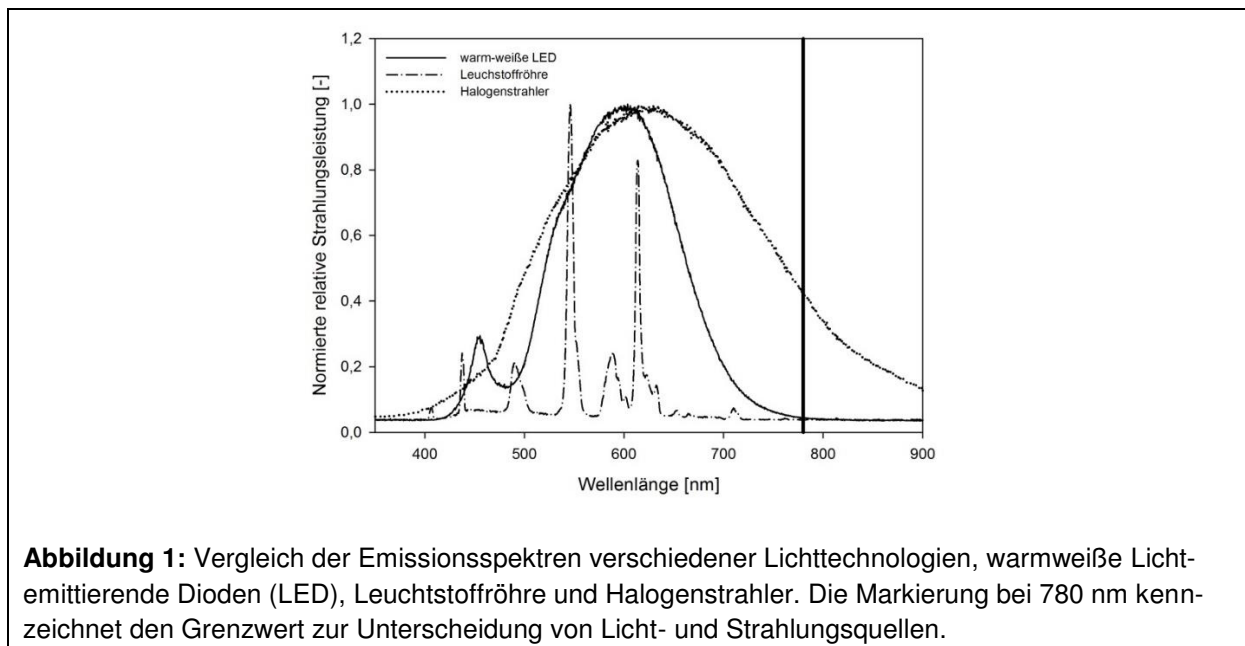
Die Beschreibung von Licht und deren assoziierten Größen, wie die Beleuchtungsstärke, wird in der Literatur sehr unterschiedlich interpretiert. Dieses Kapitel dient zum grundlegenden Verständnis und zur Unterscheidung photometrischer Größen gegenüber radiometrischen Größen mit den jeweilig verwendeten Einheiten.

In dieser Arbeit wird Licht als elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 380 nm (Blau) bis 780 nm (Rot) definiert [4]. Wird dieser Wellenlängenbereich über- oder unterschritten, unabhängig davon ob im UV- (< 380 nm) oder Infrarotbereich (> 780 nm), wird die Emission als Strahlung bezeichnet. Diese Definition bildete die grundlegende Unterscheidung zwischen photometrischen und radiometrischen Größen und ist wichtig für die Wahl der zu nutzenden Messtechnik.

Durch diese wellenlängenbezogene Definition ist festgelegt, welcher Emitter als Licht- bzw. Strahlungsquelle bezeichnet wird. In Abbildung 1 sind die normierten Emissionsspektren verschiedener, in dieser Arbeit verwendeter, Licht- bzw. Strahlungsquellen dargestellt. Der Halogenemitter wird laut Definition als Strahlungsquelle bezeichnet, da dieser elektromagnetische Strahlung im nicht-sichtbaren Wellenlängenbereich über 780 nm emittiert, wohingegen Leuchtstoffröhren und warmweiße Lichtemittierende Dioden (LEDs) als Lichtquellen bezeichnet werden.

Darauf aufbauend ergibt sich nun die Verwendung photometrischer bzw. radiometrischer Messgrößen. Die SI-Einheit für Lichtstärke, die Basiseinheit der Photometrie, ist Candela (cd

= lm sr^{-1}) und bestimmt die Intensität, die vom Emitter in einem bestimmten Raumwinkel ausgesendet wird. Betrachtet man die emittierende Rate des Lichtes erhält man den Lichtstrom mit der Einheit Lumen [lm]. Die Lichtausbeute eines elektrischen Emitters wird folglich in lm W^{-1} angegeben. Empfängerseitig ergibt sich die Beleuchtungsstärke, deren Wert in lm m^{-2} angegeben wird und der Einheit Lux [lx] entspricht. Weitere photometrische Größen sind die Leuchtdichte [nits], die Belichtung [lx s], die Lichtmenge [lm s], der Steradian [sr] und die spezifische Lichtausstrahlung [lx]. Diese Größen werden in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet.



Die Bezeichnungen der korrespondierenden radiometrischen Größen können im Wesentlichen von den photometrischen Größen abgeleitet werden. Dabei werden die Bereiche der UV- und Infrarotstrahlung nun mit eingeschlossen. Die Strahlungsstärke wird in W sr^{-1} angegeben. Der Lichtstrom ist definiert als Strahlungsfluss mit der Einheit Watt (W). Die radiometrische Größe für den Strahlungsempfänger ist die Bestrahlungsstärke in W m^{-2} . Die weiteren Messgrößen werden definiert als Strahlungsenergie [Joule], spezifische Ausstrahlung [W m^{-2}], Bestrahlung [Joule m^{-2}] und die Strahldichte [$\text{W m}^{-2} \text{sr}^{-1}$].

Eine weitere wichtige lichtbezogene Größe in der Photobiotechnologie ist die sogenannte photosynthetisch aktive Strahlung (bzw. *photosynthetic active radiation* = PAR), die für den Wellenlängenbereich von 400 nm - 700 nm definiert ist. Aufgrund der Korrelation zwischen absorbierten Photonen im PAR-Bereich und der erzielten Photosyntheseleistung hat sich in der Fachliteratur die Einheit der Photonenflussdichte (PFD bzw. *photon flux density*) für die Beschreibung von PAR-Emittlern etabliert [5]. Durch den Einsatz spektral abgestimmter Filtersysteme können Photonen mit unterschiedlichem Energiegehalt gleichmäßig gewichtet und damit die PFD von PAR-Emittlern in der Einheit $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestimmt werden.

1.2 Biologische Aspekte der Photobiotechnologie - Photosynthese

Im Laufe der Evolution haben sich eine Vielzahl von Lichtsammelmechanismen herausgebildet, jeweils adaptiert an die spezifischen spektralen Lebensbedingungen der phototrophen Organismen. Grundlegend erfolgt die Lichtsammlung über Photosysteme (PS), die aus einem Lichtsammelkomplex (LHC) und einem Reaktionszentrum (RC) aufgebaut sind [6, 7]. Die LHCs sind als Transmembranproteine in Antennen über den Reaktionszentren angeordnet. Je nach Organismus unterscheiden sich die Art des Chromophors innerhalb der Antennen und die Lokalisation in der Zelle (Abbildung 2, Tabelle 2). Die LHCs eukaryotischer Algen bestehen hauptsächlich aus Chlorophyll a und b Molekülen. Zudem erfüllen Carotinoide und Xanthophylle weitere Funktionen in der Zelle, u.a. die Erweiterung des spektral nutzbaren Bereiches aber auch eine Schutzfunktion gegenüber Radikalverbindungen. Eine Besonderheit ist im LHC von Cyanobakterien zu finden. Neben Chlorophyll a besitzen diese bakteriellen Vertreter zusätzliche Antennenpigmente, die Phycobiline (Phycoerythrin und Phycocyanin), die Licht im grünen Spektralbereich absorbieren und somit die Besiedlung sehr schwach beleuchteter Habitats ermöglichen [8]. Purpurbakterien nutzen eine spezielle Form des Chlorophylls, das so genannte Bakterienchlorophyll, das Strahlung im nahinfraroten Spektralbereich zwischen 800 nm und 870 nm als Energiequelle nutzbar macht. Zudem verfügen sie über einen hohen Anteil an Carotinoiden, die ihnen ihre charakteristische Rotfärbung verleihen [9].

Neben der spektralen Empfindlichkeit der lichtsammlenden Chromophore variiert auch die Lokalisation der Photosyntheseeinheiten in den Zellen. Eukaryotische Organismen, z.B. Mikro- und Makroalgen sind auf zellulärer Ebene in Organellen strukturiert. Die Lichtreaktion der Photosynthese findet dabei an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten statt. Photosynthetische Bakterien (Cyanobakterien, Purpurbakterien) weisen Einstülpungen der Cytoplasmamembran, sogenannte Thylakoide, die als Sitz des Photosyntheseapparates dienen, auf.

Die Chromophore der LHCs werden durch den Einfall von Photonen in einen höheren energetischen Zustand gehoben. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie (Exziton) strahlungslos an das RC weitergeleitet. Im PS wird eine Elektronentransportkette ausgelöst, die zur Erzeugung von chemisch gebundener Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten (NADH/H^+) genutzt wird. Im Gegensatz zu den umgebenden Lichtsammelkomplexen sind die RCs evolutionär hochkonservierte Bereiche, die in Form von Proteinkomplexen in die jeweiligen Membranen verankert sind. Sie werden grundlegend nach ihren terminalen Elektronenakzeptoren in Typ I RC (FeS-Zentrum) und Typ II RC (Chinone) unterschieden (Abbildung 3) [10].

Tabelle 2: Übersicht mikrobieller Photosynthesepigmente, deren zelluläre Lokalisation und Absorptionsbereiche.

Chromophore	Organismus	Bereich	Lichtsammelkomplex	Zelllokalisation	Absorption [nm]
Chlorophyll a	Landpflanzen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Thylakoidmembran der Chloroplasten	400-450, 650-700
	Algen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Cytoplasmatische Membran	
	Cyanobakterien	Prokaryot	Thylakoid		
Chlorophyll b	Landpflanzen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Thylakoidmembran der Chloroplasten	450-500, 600-650
	Algen	Eukaryot	LHCI, LHCII		
	Cyanobakterien	Prokaryot			
Phycoerythrin	Cyanobakterien	Prokaryot	Phycobilisom	Cytoplasmatische Membran	495-600
Phycocyanin	Cyanobakterien	Prokaryot	Phycobilisom	Cytoplasmatische Membran	500-660
Allophycocyanin	Cyanobakterien	Prokaryot	Phycobilisom	Cytoplasmatische Membran	500-660
Xanthophylle	Landpflanzen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Thylakoidmembran der Chloroplasten	400-530
	Algen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Cytoplasmatische Membran	
	Cyanobakterien	Prokaryot	Thylakoid	Cytoplasmatische Membran	
	Purpurbakterien	Prokaryot	LHI, LHII		
Carotinoide	Landpflanzen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Thylakoidmembran der Chloroplasten	400-500
	Algen	Eukaryot	LHCI, LHCII	Cytoplasmatische Membran	
	Cyanobakterien	Prokaryot	Phycobilisom	Cytoplasmatische Membran	
	Purpurbakterien	Prokaryot	LHI, LHII		
Bacteriochlorophyll a	Purpurbakterien	Prokaryot	LHI, LHII	Cytoplasmatische Membran	800-870
Bacteriochlorophyll b	Purpurbakterien	Prokaryot	LHI, LHII	Cytoplasmatische Membran	800-870

* LHC = Light Harvesting complex (=Lichtsammelkomplex)

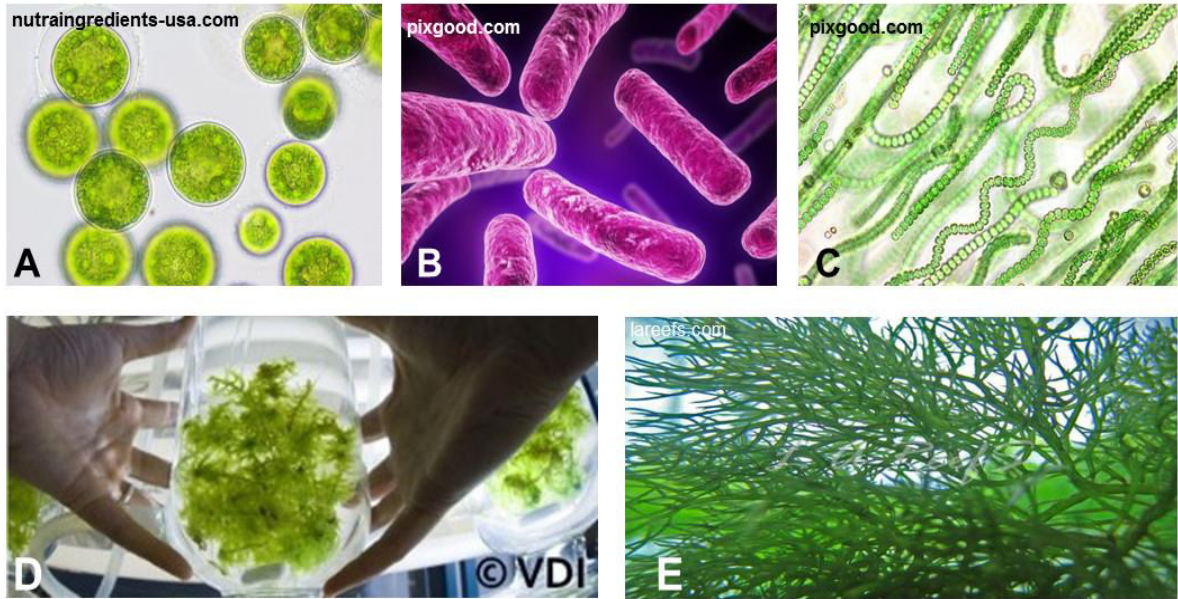


Abbildung 2: Übersicht über photosynthetisch aktive Organismen: (A) *Nannochloropsis oculata* (nutraingredients.com), (B) Purpurbakterium (pixgood.com), (C) Cyanobakterium *Spirulina* ssp. (pixgood.com), (D) Mooskultur (VDI), (E) Makroalgen (lareefs.com).

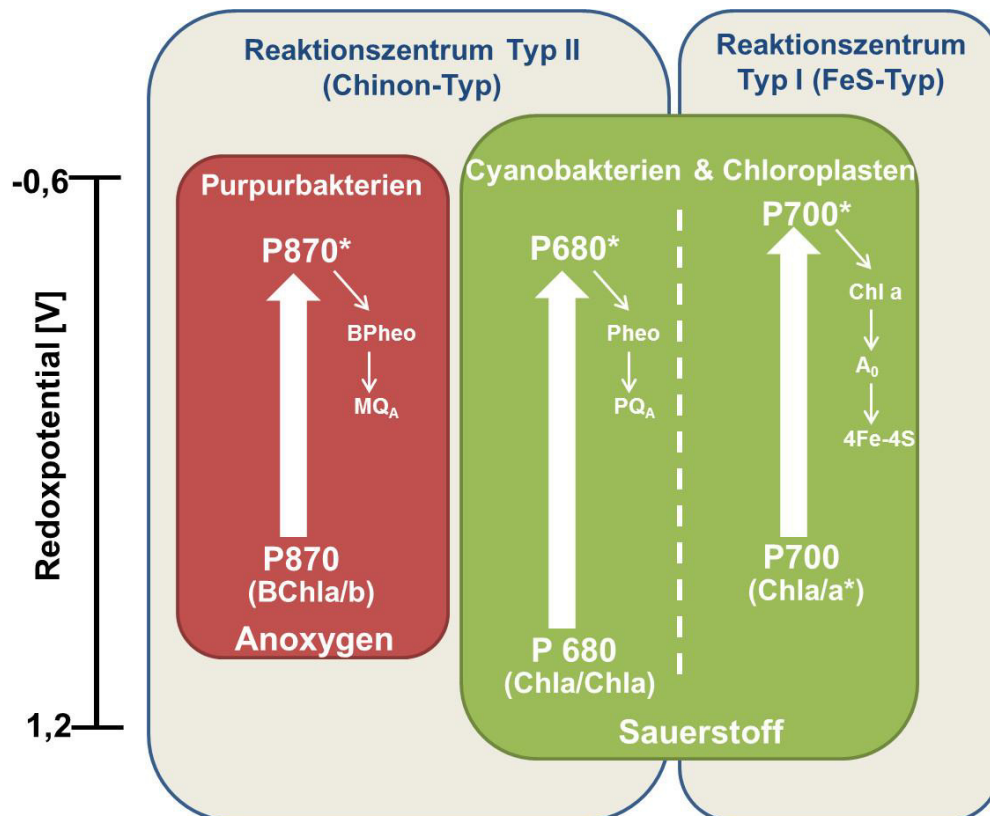


Abbildung 3: Redoxpotentiale und Vorkommen des Typ I- und Typ II-Reaktionszentrums.

1.2.1 Oxygene Photosynthese

Algen, Cyanobakterien und Landpflanzen verfügen über zwei Photosysteme, das P680 (auch PSII, Typ II RC) und P700 (auch PSI, Typ I RC) und führen eine oxygene, d.h. eine sauerstoffproduzierenden Photosynthese durch. In diesen Organismen sind die beiden Photosysteme nacheinander geschaltet (Abbildung 4).

Der Lichtsammelkomplex des Photosystem II (LHCII) besteht vorwiegend aus Chlorophyll a, Chlorophyll b und verschiedenen Carotinoidmolekülen, die über ein Proteingerüst in die Granathylakoidmembran eingebettet sind. Das Typ II RC des P680 in phototrophen Eukaryoten und Cyanobakterien ist mit einem wasserspaltenden Komplex verbunden und bildet somit die Grundlage für die autotrophe Photosynthese [11]. Die zwei zentralen Chlorophyllmoleküle (P680, *special pair*) übernehmen die Exzitonen des LHC. Die Ladungstrennung (Quantenausbeute von 85%) erfolgt durch die Übertragung eines Elektrons des „*special pairs*“ auf den primären Elektronenakzeptor Phäophytin (Phe). Das dadurch entstandene Redoxpotential von 1,1 V erlaubt es dem wasserspaltenden Komplex, Wasser in Protonen, Sauerstoff und Elektronen zu spalten [12]. Die Elektronenlücke am „*special pair*“ (positiv geladenes Chlorophyllradikal) wird durch den Elektronenentzug eines Tyrosinrestes geschlossen. Das dabei entstandene Tyrosinradikal wird durch Elektronen aus der Wasserspaltung (Kok-Zyklus) über ein Mangan-Calcium-Cluster regeneriert [13]. Das durch die Lichtanregung frei gewordene Elektron (Phe) wandert schließlich zu einem auf der gegenüberliegenden Membranseite lokalisierten mobilen Träger (Plastochinon). Nach zweimaliger Reduktion und Protonierung aus dem Stroma diffundiert dieser als Plastochinol in die Membranmatrix zum Cytochrom b_6/f -Komplex [14]. Über das so genannte Rieske-Protein (2Fe-2S-Cluster) wird dem Plastochinol ein Elektron entzogen. In einem zyklischen Elektronentransport (Q-Zyklus) werden zwei Protonen ins Lumen der Membran gepumpt. Das zweite Elektron wird durch zwei Cytochrome des b-Typs durch einen linearen Elektronenfluss auf Plastocyanin (PC) übertragen. Dieser wasserlösliche Carrier diffundiert durch das Lumen des Thylakoiden zum PS I. Im Unterschied zum P680 ist die Kernantenne (LHCI) des P700 in das Reaktionszentrum und in die Stromalamellen der Thylakoidmembran integriert. Durch Absorption eines Photons und Weiterleitung an das RC I wird ein Elektron von Chlorophyll a auf ein weiteres Chlorophyll a Molekül übertragen. Im Folgenden werden mehrere Fe-S-Zentren durchlaufen, bevor das Elektron auf das stromaseitige Ferredoxin (Fe-S-Zentrum) übertragen wird. Das reduzierte Ferredoxin (Fd) bindet eine NADP⁺-Reduktase und reduziert NADP⁺ zu NADPH. Die Elektronenlücke am PS I wird durch den Carrier PC geschlossen, der im oxidierten Zustand zurück zum PS II diffundieren kann.

1.2.2 Anoxygene Photosynthese

Auch bei der anoxygenen Photosynthese unterscheidet man in Typ I RC (Grüne Schwefelbakterien, Heliobacteriaceae) und Typ II RC (Purpurbakterien, Chloroflexi) [15].

Schwefelfreie Purpurbakterien verfügen ebenfalls über ein Typ II Reaktionszentrum. Durch das Fehlen des wasserspaltenden Komplexes am RC II und das daraus resultierende geringe Redoxpotential ist es diesen Organismen nicht möglich Wasser als Elektronendonator zu nutzen. Auf Grund dessen, dass kein Sauerstoff freigesetzt wird, wird dieser Bioprozess als anoxygene Photosynthese bezeichnet.

Das durch Photonen angeregte Bakteriochlorophyllpaar (*special pair*) im P870 gibt sein Elektron an ein Bakteriophäophytin (BPhe) ab. Von dort gelangt es auf ein Menanchinon (Typ II RC) bevor es nach zweifacher Reduktion als Chinol zum Cytochrom bc_1 -Komplex durch die Membran diffundiert. Von hier aus können die Elektronen über einen zyklischen Elektronentransport, vermittelt über Cytochrome, zurück zum Reaktionszentrum unter Erzeugung einer protonenmotorischen Kraft mit anschließender ATP-Synthese gelangen oder in einem nicht-zyklischen Prozess für die Gewinnung des Reduktionsäquivalents $NADP^+$ genutzt werden. Da in diesem Fall das Bakteriochlorophyll in einem positiv geladenen Radikalzustand verbleibt, müssen Elektronen von einem externen Elektronendonator zum Schließen dieser Elektronenlücke gewonnen werden. Hierfür können verschiedene organische Verbindungen, z.B. organische Säuren oder Zucker, genutzt werden [16].

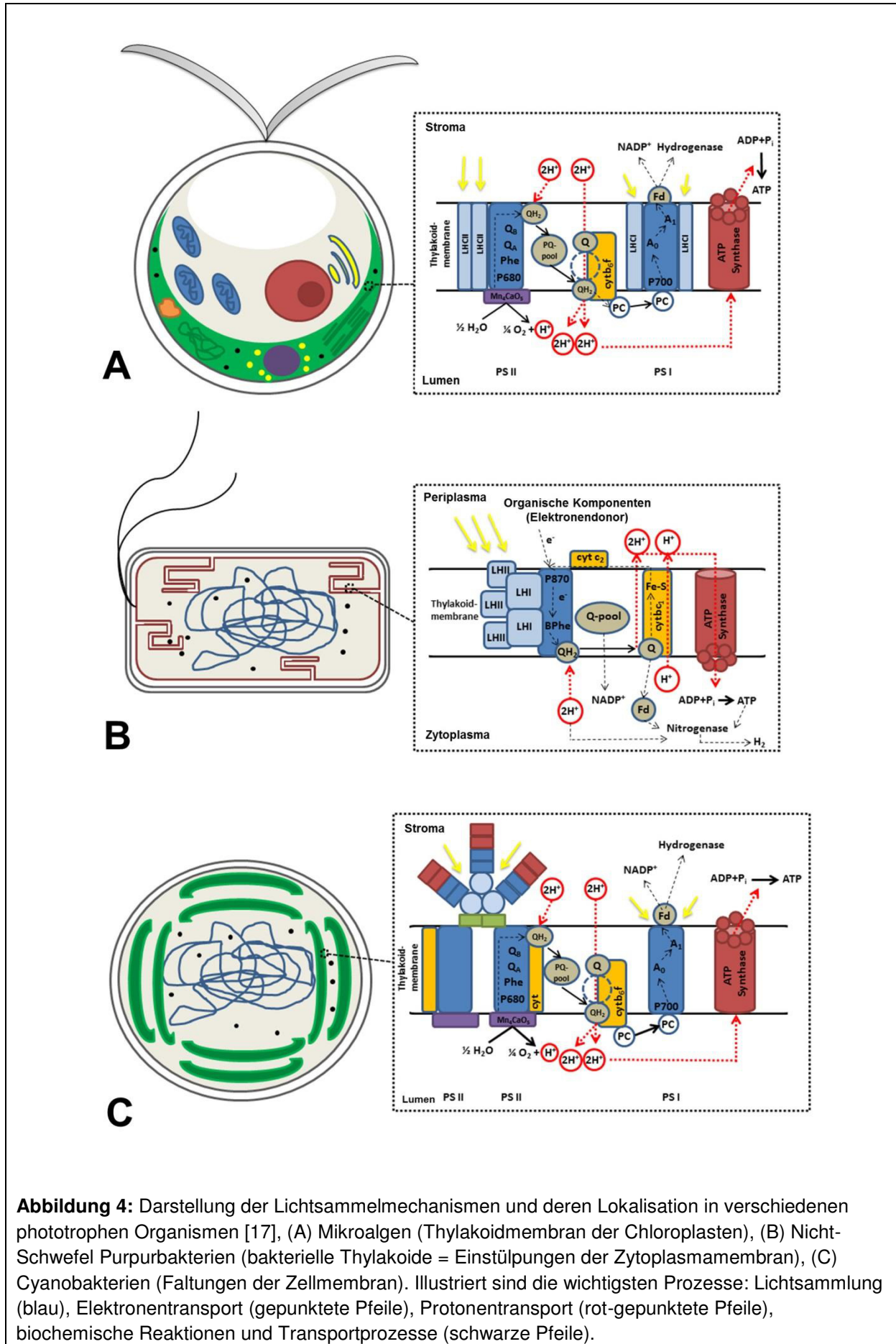
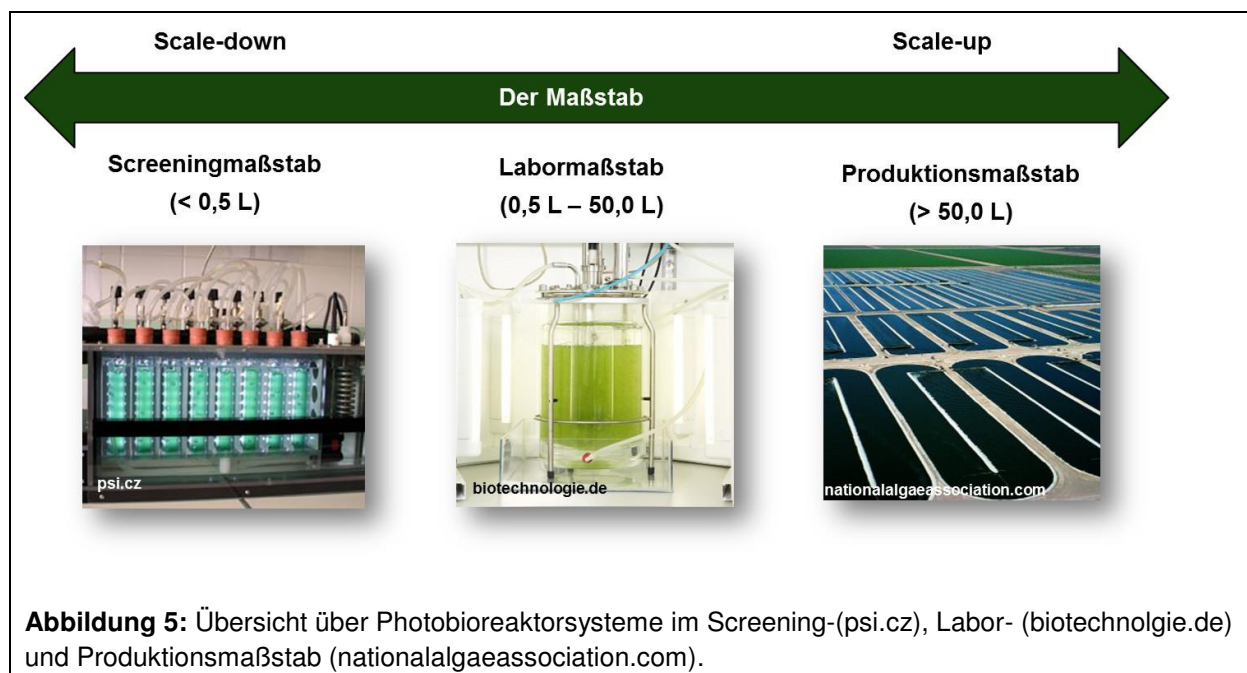


Abbildung 4: Darstellung der Lichtsammelmechanismen und deren Lokalisation in verschiedenen phototropen Organismen [17], (A) Mikroalgen (Thylakoidmembran der Chloroplasten), (B) Nicht-Schwefel Purpurbakterien (bakterielle Thylakoide = Einstülpungen der Zytoplasmamembran), (C) Cyanobakterien (Faltungen der Zellmembran). Illustriert sind die wichtigsten Prozesse: Lichtsammung (blau), Elektronentransport (gepunktete Pfeile), Protonentransport (rot-gepunktete Pfeile), biochemische Reaktionen und Transportprozesse (schwarze Pfeile).

1.3 Technische Aspekte der Photobiotechnologie - Photobioreaktoren

Um die in Kapitel 1.2 beschriebenen photosynthetischen Bioprozesse nutzbar zu machen, ist eine technische Umgebung notwendig, welche die erforderlichen Reaktionsbedingungen, d.h. eine ausreichende Versorgung mit Kohlenstoffdioxid, Wasser, Nährstoffen zum Aufbau von Biomasse und PAR-Strahlung [18] zur Verfügung stellt. Diese für photobiologische Prozesse ausgelegten Reaktorsysteme werden als Photobioreaktoren bezeichnet. Photobioreaktoren unterscheiden sich erheblich in ihrer Konstruktion, den verwendeten Materialien und ihrer strukturellen Komplexität. Eine Klassifizierung von Photobioreaktoren erfolgt anhand des Maßstabs (Labor- oder Produktionsmaßstab), der genutzten Lichttechnologie (Sonnenlicht oder artifizielles Licht) oder ihrer Betriebsweise (offene oder geschlossene Systeme).

Je nach Volumen und Zeitpunkt des Einsatzes in der Bioprozessentwicklung unterscheidet man Photobioreaktoren in unterschiedlichen Maßstäben (Abbildung 5). Im Folgenden werden die jeweiligen Maßstäbe mit den damit einhergehenden Vor- und Nachteilen detailliert betrachtet.



1.3.1 Screeningmaßstab (0,01 L - 0,5 L)

Die Bezeichnung „Screeningmaßstab“ wird in der Fachliteratur nicht für die Klassifizierung von Bioreaktoren verwendet. In dieser Arbeit wird dieser Maßstab jedoch für Kultivierungssysteme mit einem Arbeitsvolumen zwischen 10 mL und 500 mL definiert.

Dieser Maßstab ist aufgrund des hohen Parallelisierungsgrades essentiell für die frühe Phase der Bioprozessentwicklung, weil durch den steigenden experimentellen Durchsatz die Entwicklungszeit von Prozessen bis zur Marktreife (*time-to-market*) signifikant verkürzt wird.

Die entscheidende Herausforderung bei der Kultivierung von Mikroorganismen in diesem Maßstab ist das online-Monitoring wichtiger Prozessgrößen, z.B. Biomasse, pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration, und die Skalierung der entwickelten Bioprozesse in den Labor-Maßstab.

Der einfachste und meist genutzte Bioreaktor, der für das Screening von Produktionsstämmen oder die Bioprozessentwicklung photosynthetisch aktiver Mikroorganismen eingesetzt wird, ist der Schüttelkolben in beleuchteten Schüttelinkubatoren (Abbildung 6). Kommerzielle Schüttelsysteme sind z.B. durch die Infors GmbH (Minitron), die Sartorius AG (Certomat BS-1) oder Photon Instrument Systems (AlgaeTron 230) verfügbar. Die prozessbegleitende Analytik erfolgt in geschüttelten Systemen in der Regel durch offline-Analytik. Eine Ausnahme stellt die Entwicklung einer LED-basierten Beleuchtungseinheit für das *Respiratory Activity Monitoring System* (RAMOS) der HiTec Zang GmbH dar. Der als Cultilux bezeichnete Inkubator verfügt über eine Abgasanalyse, welche die Detektion der Sauerstofftransfer- und Kohlenstoffdioxidtransferrate zugänglich macht [19].



Abbildung 6: AlgaeTron 230 Schüttelkultivierungssystem für phototrophe Organismen von Photon Systems Instruments (psi.cz).

Neben dem geringen Potenzial der Prozessüberwachung und -steuerung weisen Schüttelkolbensysteme weitere Nachteile auf, u.a. eine begrenzte Skalierbarkeit auf Produktionssysteme aufgrund der Oberflächenbegasung des Kulturmediums.

Weitere miniaturisierte und parallelisierbare Kultivierungssysteme sind Gegenstand aktueller Forschung und Entwicklung. Kandilian et al. [20] stellten einen LED-beleuchteten Plattenreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 70 mL vor, der als Blasensäule zur Kultivierung der Mikroalge *Nannochloropsis oculata* betrieben wurde. Ein weiterer miniaturisierter Kultivierungsansatz wurde aus derselben französischen Arbeitsgruppe publiziert und sieht parallelisierte Blasensäulen mit einem Arbeitsvolumen von 30 mL vor [21]. Die benannten Kultivierungssysteme zeichnen sich durch eine Automatisierung hinsichtlich Medienzufuhr und

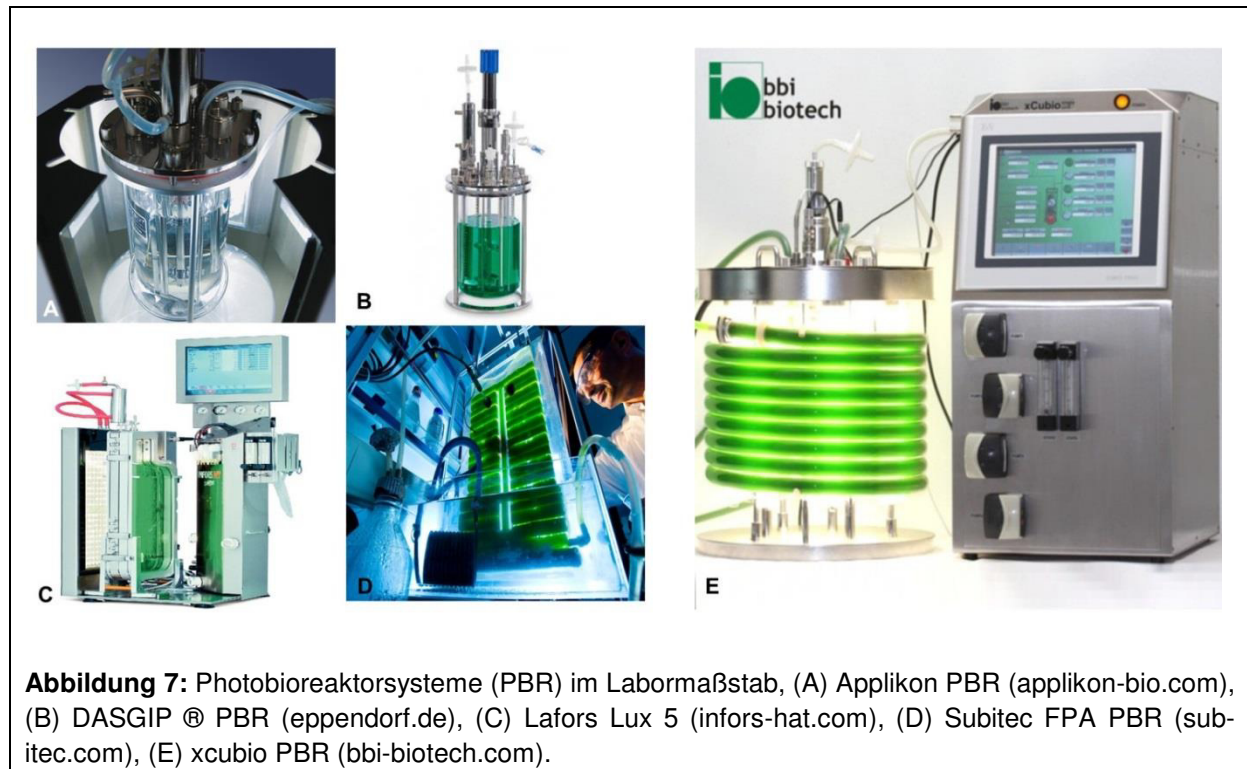
Lichtkontrolle aus. Die Aufzeichnung von online-Daten über die Dynamik der Prozessparameter in der Suspension wird in diesen Systemen allerdings nicht berücksichtigt.

1.3.2 Labormaßstab (0,5 L - 5,0 L)

Der Labormaßstab verfügt über die größte Anzahl an kommerziell verfügbaren Photobioreaktoren [22]. Durch die Vergrößerung des Arbeitsvolumens kann standardisierte Mess- und Sensortechnik in diese Kultivierungssysteme integriert werden. Die Möglichkeiten der Mess- und Prozessautomation spiegeln sich allerdings in sehr hohen Anschaffungskosten von mehr als 50.000 Euro wieder. Eine Parallelisierung von Photobioreaktoren im Labormaßstab ist durch die hohen Rüstzeiten und dem damit verbundenen Arbeitsaufwand deshalb aus wirtschaftlicher Sicht nicht sinnvoll. Dieser Maßstab wird für *scale-up* Studien favorisiert, wenn entsprechende Bioprozesse im Screeningmaßstab etabliert werden konnten. Beispielhaft werden hier einige Systeme vorgestellt.

Die einfachste Möglichkeit, etablierte Bioreaktorsysteme für die Kultivierung phototropher Organismen nutzbar zu machen, ist die Aufrüstung mit einer externen Beleuchtungseinheit. Dieses Prinzip wurde für verschiedene Rührkesselreaktoren angewendet. In Abbildung 7 ist ein Applikon-Rührkesselreaktor dargestellt, dessen transparentes Reaktorgefäß über externe Leuchtstoffröhren beleuchtet wird. Neben den Leuchtstoffröhren werden hauptsächlich warmweiße LEDs für die Beleuchtung der Bioreaktoren genutzt, u.a. bei Infors HT. Ein Rührkesselreaktor mit interner LED-Beleuchtung wird durch die Eppendorf AG (ehemals DAS-GIP®) vertrieben. Neben den Rührkesselreaktoren stellen Plattenreaktoren, die als Blasensäulen oder Airliftreaktoren betrieben werden, die häufigste Form von Photobioreaktoren in diesem Maßstab dar. Zwei der etabliertesten Systeme sind der Labfors 5 lux (Infors HT), ein Platten-Airlift-Bioreaktor, der mittels 260 LEDs eine Photonenflussdichte von bis zu 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erzielt, und das Kultivierungssystem der Subitec GmbH, welches aus Kunststofffolien zusammengesetzt ist und durch seine Form eine gezielte Bewegung der phototrophen Organismen im Lichtfeld induziert.

Ein weiteres interessantes Reaktorsystem wurde durch die IGV Biotech entwickelt und nun durch bbi biotech vertrieben. Der x cubio ist ein tubuläres Kultivierungssystem, welches über ein umfassendes Prozessmonitoring verfügt. Die Geometrie ermöglicht einen geringen Fließwiderstand und eine direkte Übertragung auf Röhrensysteme im Pilot- und Produktionsmaßstab.



1.3.3 Produktionsmaßstab (> 50 L)

Bei der Kultivierung phototropher Organismen im Produktionsmaßstab wird zwischen offenen und geschlossenen Reaktorsystemen unterschieden [23]. Offene Systeme umfassen sowohl künstlich angelegte Seen als auch aktiv durchmischte Raceway-Ponds (Abbildung 8). Pond-Systeme sind die verbreitetsten Photobioreaktoren im Produktionsmaßstab und zeichnen sich durch ihre einfache Konstruktion und vergleichsweise geringen Anschaffungs- und Betriebskosten [24] aus. Jedoch sind offene Kultivierungssysteme den wechselnden klimatischen Bedingungen ausgesetzt und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen. Nichtsdestotrotz werden Pond-Systeme bereits seit den 80er Jahren genutzt um Cyanobakterien (z.B. *Spirulina platensis*) unter selektiven Kultivierungsbedingungen im großen Maßstab für den Nahrungsergänzungsmittelmarkt zu produzieren. So genannte „*Spirulina Farms*“ werden u.a. durch Earthrise Nutritionals (Kalifornien, USA) oder Cyanotech (Hawaii, USA) betrieben.

Im Bereich der geschlossenen Produktionssysteme haben sich tubuläre Reaktorsysteme und Plattenreaktoren in verschiedenen Ausführungen etabliert. Einer der größten Röhrenreaktoren (über 500 km Gesamtlänge) wird durch das Unternehmen Roquette Klötze GmbH & Co. KG in Klötze (Sachsen-Anhalt, Deutschland) zur Anzucht der Mikroalge *Chlorella vulgaris* betrieben. Doch auch auf diesem Gebiet werden neue technologische Entwicklungen vorgestellt. Die GICON GmbH entwickelte ein Röhrenreaktorsystem, das aufgrund seiner kegelförmigen Geometrie eine optimale Lichtverfügbarkeit für die photosynthetischen Organismen

gewährleistet (Abbildung 8C), den so genannten Tannenbaumreaktor. Zudem ermöglicht die Verwendung von Kunststoffschläuchen unterschiedlicher Durchmesser eine aktive Temperierung des Reaktorsystems. Mit Hilfe des sogenannten Pulsbetriebs, d.h. sequentiell durchgeführte Pumpstöße, wurde die Raum-Zeit-Ausbeute von Photobioprodukten signifikant gesteigert.



Ein weiterer führender Anbieter von Photobioreaktortechnik im Produktionsmaßstab ist das österreichische Unternehmen ecoduna-Produktions GmbH. Das mehrfach ausgezeichnete Konzept der „hängenden Gärten“ (Abbildung 8D) besteht aus Kunststoffplattenreaktoren, die zum einen das Prinzip der Oberflächenvergrößerung von Bäumen nachempfinden und zum anderen nach dem Vorbild der Sonnenblume aktiv zum Stand der Sonne ausgerichtet werden können. Es gibt zahlreiche weitere Reaktorkonzepte innerhalb der Röhren- und Plattenreaktoren. Zu den wichtigsten Anbietern in Deutschland zählen weiterhin die Subitec GmbH, die NOVAgreen Projektmanagement GmbH und die Phytolutions GmbH.

1.4 Problemstellung und Herausforderungen

Trotz der vielseitigen Potentiale ist die Photobiotechnologie noch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Laut Positionspapier der DECHEMA Fachgruppe „Algenbiotechnologie“ besteht unter anderem in den Bereichen Stammhaltung, molekularbiologische Techniken, physiologische Charakterisierung und Etablierung geeigneter Kultivierungskonzepte erheblicher Forschungsbedarf [25]. Aus diesem Grund werden heute von geschätzten 500.000 Algenspezies lediglich 15 Mikro- und 220 Makroalgen technisch genutzt.

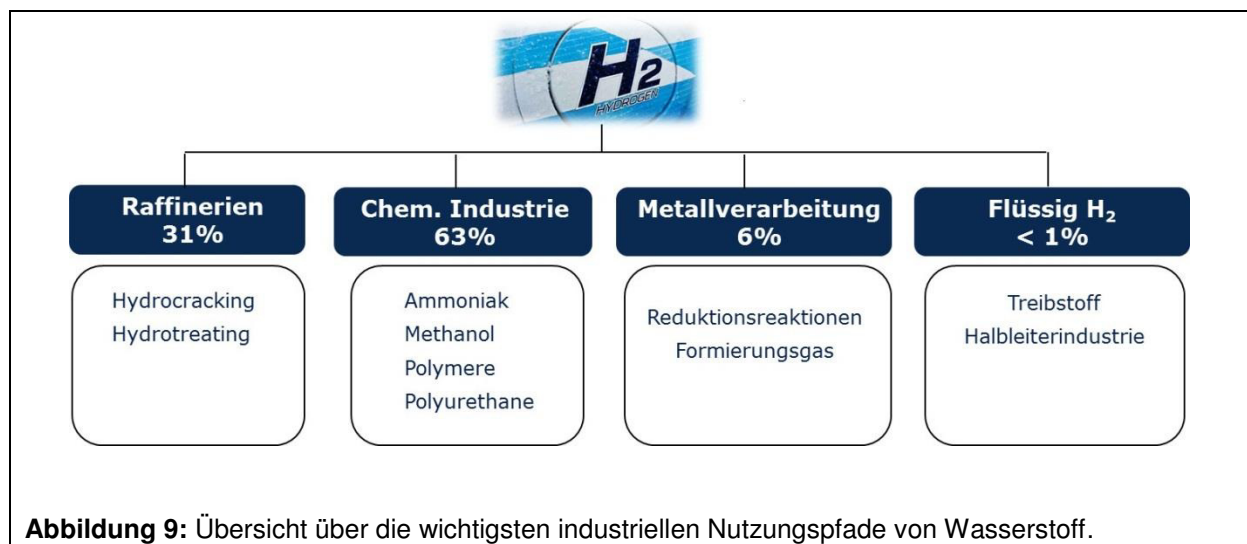
Ziel dieser Arbeit ist es, neue Kultivierungskonzepte für phototrophe Organismen zu etablieren, die ein vertieftes Prozessverständnis von photobiologischen Prozessen ermöglichen. Dabei sollen nicht-invasive Sensorsysteme zur Analyse photobiotechnologischer Prozesse, moderne Fertigungsmethoden und alternative Lichttechnologien in Betracht gezogen und anhand konkreter Beispiele evaluiert werden.

2. Prozessentwicklung zur photofermentativen Produktion von Wasserstoffgas mittels *Rhodobacter sphaeroides* DSM158

2.1 Einleitung

2.1.1 Photobiotechnologische Wasserstoffproduktion

Wasserstoff zählt zu einem der wichtigsten Rohstoffe, u.a. für traditionelle Synthesen und Reaktionen in der chemischen Industrie aber auch für zukünftige und noch nicht vollständig erschlossene Anwendungen wie beispielsweise als sauberer Treibstoff der zukünftigen Mobilität. Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die zurzeit wichtigsten industriellen Nutzungspfade von molekularem Wasserstoff.

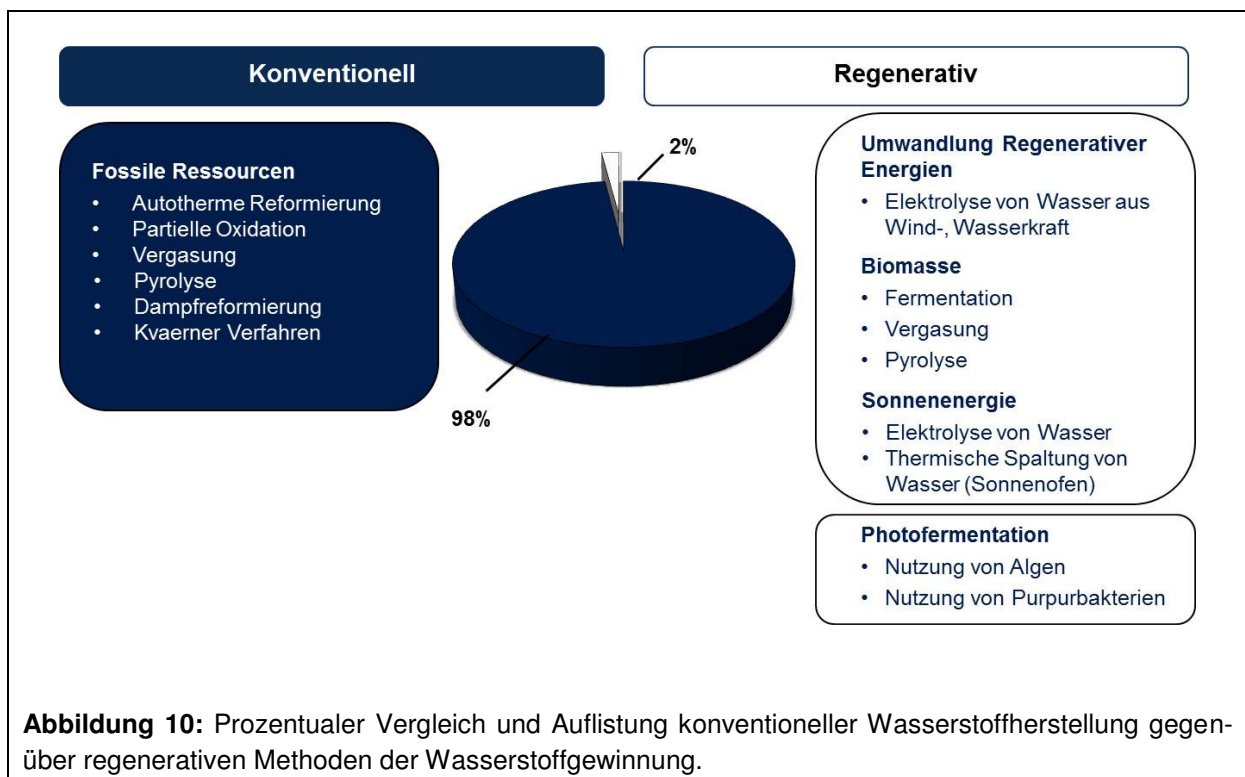


Aktuell werden ca. 96 % des jährlich produzierten Wasserstoffs durch Reformationsprozesse oder partielle Oxidation von Erdöl und Erdgas gewonnen (Abbildung 10) [26]. Die Verknappung der fossilen Ressourcen erfordert die Entwicklung nachhaltiger und regenerativer Verfahren zur Gewinnung dieses wichtigen Rohstoffes. „Grüne“, d.h. sowohl regenerative als auch nachhaltige Verfahren zur Wasserstoffproduktion sind u.a. die Wasserelektrolyse unter Verwendung regenerativ erzeugter Elektrizität, Wasserspaltung durch Solarenergie oder die Dunkelfermentation bzw. Vergasung von Biomasse [27]. Die Wasserspaltung durch lichtgetriebene Bioprozesse in Mikroorganismen ist noch ein sehr junges Forschungsgebiet und stellt eine weitere nachhaltige Quelle für molekularen Wasserstoff dar. Im Jahre 2012 befand die Nationale Akademie der Wissenschaften „Leopoldina“ in ihrem Leitpapier „Bioenergie: Möglichkeiten und Grenzen“ [28]:

„In Anbetracht der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit von Wasser und Sonnenlicht könnte die Produktion von Wasserstoff durch direkte photolytische Spaltung von Wasser mit Hilfe

phototropher Mikroorganismen einen idealen Energieträger liefern, der sowohl erneuerbar als auch umweltfreundlich und nachhaltig ist. Ob und wann die Bildung von Wasserstoff durch natürliche Photosynthese-Systeme technisch einsatzfähig wird, ist allerdings offen und Gegenstand laufender Grundlagenforschung.“

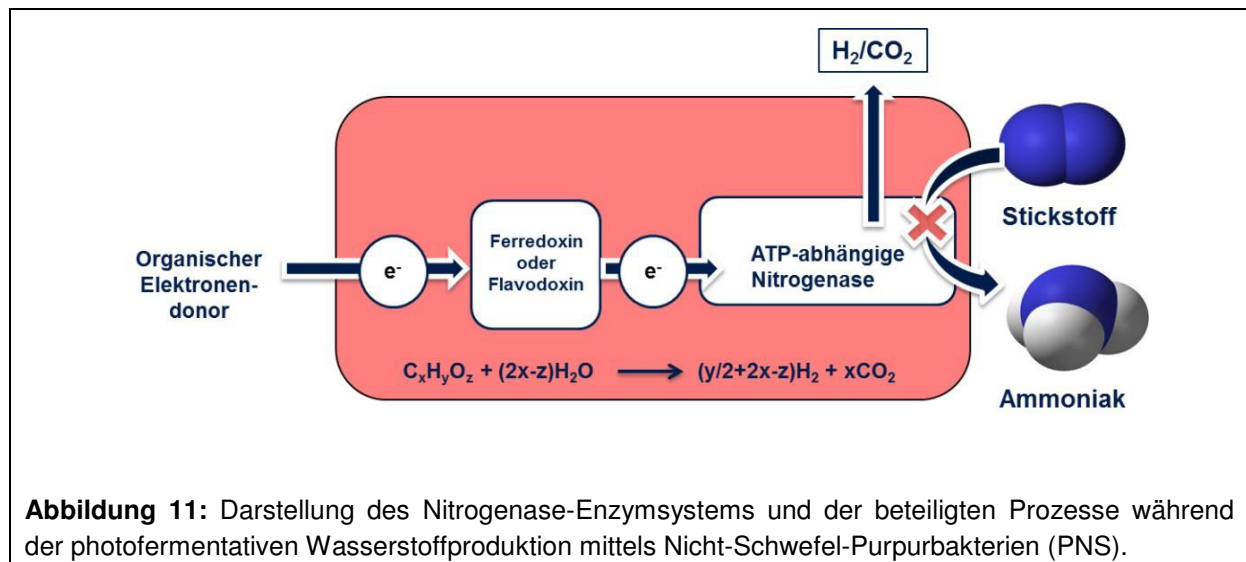
Nach Hallenbeck und Benemann [2] werden photobiologische Prozesse zur Wasserstoffsynthese in folgende Kategorien unterteilt: direkte Biophotolyse, indirekte Biophotolyse und Photofermentation. Direkte und indirekte Biophotolyse bezeichnen Hydrogenase abhängige Prozesse, die in Mikroalgen und Cyanobakterien unter Schwefellimitierenden Bedingungen induziert werden [29].



Die photofermentative Produktion von molekularem Wasserstoff durch schwefelfreie Purpurbakterien (PNS) erfolgt durch das Nitrogenase-Enzymsystem, welches unter nativen Bedingungen die Konversion von molekularem Stickstoff zu Ammonium katalysiert. Die Transkription der Nitrogenase codierenden Gene wird demnach durch einen Stickstoffmangel initiiert [30]. PNS Bakterien gehören zur metabolisch vielseitigen Abteilung der Proteobakterien. Das bakterielle Photosystem besteht vorwiegend aus Bakterienchlorophyll a und einem Reaktionszentrum des Fe-S-Typs [17]. Unter anaeroben Bedingungen führen PNS-Bakterien photoheterotrophes Wachstum durch, welches das Vorhandensein eines externen organischen Elektronendonators voraussetzt [31]. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl organische Säuren als auch Zucker diese Funktion übernehmen können [32].

2.1.2 Kultivierungsbedingungen für PNS-Bakterien mit dem Ziel der Wasserstoffproduktion

Die Wasserstoffsynthese durch die ATP-abhängige Aktivität der Nitrogenase erfordert spezifische Kultivierungsbedingungen (Abbildung 11).



Eine ausreichende Versorgung des bakteriellen Lichtsammelkomplexes (hauptsächlich Bakterienchlorophyll a, 800 - 870 nm) der PNS-Bakterien ist essentiell für die lichtgetriebene ATP-Synthese. Die zelluläre Lichtverfügbarkeit wird neben der Intensität der einfallenden Strahlung vor allem durch die Selbstabschattung der Bakterienzellen bestimmt [33]. Aus diesem Grund muss die katalytisch aktive Biomasse als Prozessparameter mit berücksichtigt werden. Die Katalyseaktivität der Nitrogenase wird zudem durch die Prozessparameter Temperatur und pH-Wert bestimmt. Optimale Bedingungen für die Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* KD131 wurden durch Kim et al. [34] zu 30 °C und pH 7,0 - 7,5 bestimmt. Da die Transkription und Aktivität der Nitrogenase durch die Stickstoffkonzentration im Kulturmedium beeinflusst wird, ist das C:N-Verhältnis ein weiterer wichtiger Kultivierungsparameter. Eroglu et al. [35] identifizierten ein begünstigtes Biomassewachstum von *R. sphaeroides* O.U.001 bei einem C:N-Verhältnis von 7,5:10, wobei eine verstärkte Wasserstoffproduktion bei einem C:N-Verhältnis von 15:2 initiiert wurde. Neben dem Verhältnis der Kohlenstoff- zu Stickstoffquelle hat auch die Art der Stickstoffverbindung Einfluss auf die Nitrogenaseaktivität. Glutaminsäure und Hefeextrakt wurden in zahlreichen Studien als bevorzugte Stickstoffquellen für die photoheterotrophe Biomassebildung identifiziert, wohingegen Ammonium zu einer reversiblen Inhibition der Nitrogenaseaktivität führt [36].

Zudem agiert Sauerstoff als transkriptioneller Regulator der Nitrogenase codierenden Gene. Dieser Mechanismus ist aufgrund der Sauerstoffsensitivität des Fe-S-Cluster im aktiven

Zentrum des Nitrogenase-Enzymkomplexes essentiell für eine effiziente Regulierung des bakteriellen Metabolismus [37]. Demnach sollten für die uneingeschränkte Aktivität der Nitrogenase strikt anaerobe Bedingungen gewährleistet werden.

2.1.3 Prozessführung für die anaerobe Kultivierung von PNS-Bakterien

Die spezifischen Kultivierungsbedingungen zur photofermentativen Wasserstoffproduktion stellen ebenfalls hohe Anforderungen an die Prozessführung. Aufgrund der Anforderung, unter sauerstofffreien Bedingungen zu kultivieren, wurden Studien zur Wasserstoffproduktion mittels PNS-Bakterien vorwiegend im Satzbetrieb, im Zulaufverfahren (Fed-Batch) oder semi-kontinuierlichen Verfahren realisiert. Kim und Kim [38] ersetzten einmal pro Tag einen Teil des Reaktorvolumens mit frischem Medium und bezeichneten das Verhältnis der beiden Volumina als „*Decanting volume ration (DVR)*“. Ein DVR von 60 % resultierte dabei in einer semikontinuierlichen Wasserstoffproduktion mit einer maximalen volumetrischen Rate von $62,25 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Vergleichbare Repeated-Batch Ansätze wurden von Pattanamanee et al. [39] und Yetis et al. [40] durchgeführt, wobei säurehydrolysierte Trauben der Ölpalme und Abwässer der zuckerverarbeitenden Industrie als organische Elektronendonatoren genutzt wurden. Eine interessante Prozessführung für die Fed-Batch Kultivierung von *R. sphaeroides* ZX-5 wurde von Li et al. etabliert [41]. Dabei wurde das Redoxpotential des Mediums als Regelparameter für die Dosierung des organischen Elektronendonators genutzt. Zagrodnik et al. [42] immobilisierten *R. sphaeroides* O.U.001 auf porösen Glasträgern und erzielten in einem Repeated-Batch Verfahren eine volumetrische Wasserstoffproduktionsrate von $59 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die ersten Arbeiten zur kontinuierlichen Wasserstoffproduktion mittels *R. sphaeroides* wurden von Fascetti und Todini [43] beschrieben, die in einem ein- und zweistufigen Chemostatverfahren eine maximale Wachstumsrate von $0,067 \text{ h}^{-1}$ und eine volumetrische Wasserstoffproduktionsrate von $66 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmten.

2.1.4 Ermittlung der zellulären Lichtverfügbarkeit in Photobioreaktoren (PBR)

Für die Bewertung und Optimierung lichtgetriebener Bioprozesse ist die Ermittlung der zellulären Lichtverfügbarkeit in PBRs eine wichtige Voraussetzung. Um exakte Angaben über die zeitlich veränderlichen Bedingungen in PBRs zu erhalten, müssen mehrere Parameter berücksichtigt werden. Bei einer Beleuchtung über die Reaktoroberfläche sind das die Lichtausbreitung an der Lichtquelle bzw. die Lichthomogenität auf der Reaktoroberfläche, die physikalischen Zusammenhänge beim Eintritt der Strahlung in des Reaktorgefäß, die Lichtverteilung innerhalb des Reaktorvolumens, das durch Absorptions- und Streuungseffekte bestimmt wird und die zelluläre Bewegung innerhalb des Reaktorvolumens bedingt durch den mechanischen oder pneumatischen Leistungseintrag in die flüssige Phase. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, die mittels empirischer Modelle die Lichtverteilung in

künstlich beleuchteten Labor-PBRs untersuchten. Zu den modellierten künstlichen Lichtquellen zählen optische Fasern [44-46], Leuchtstoffröhren [47, 48] und lichtemittierende Dioden [49, 50].

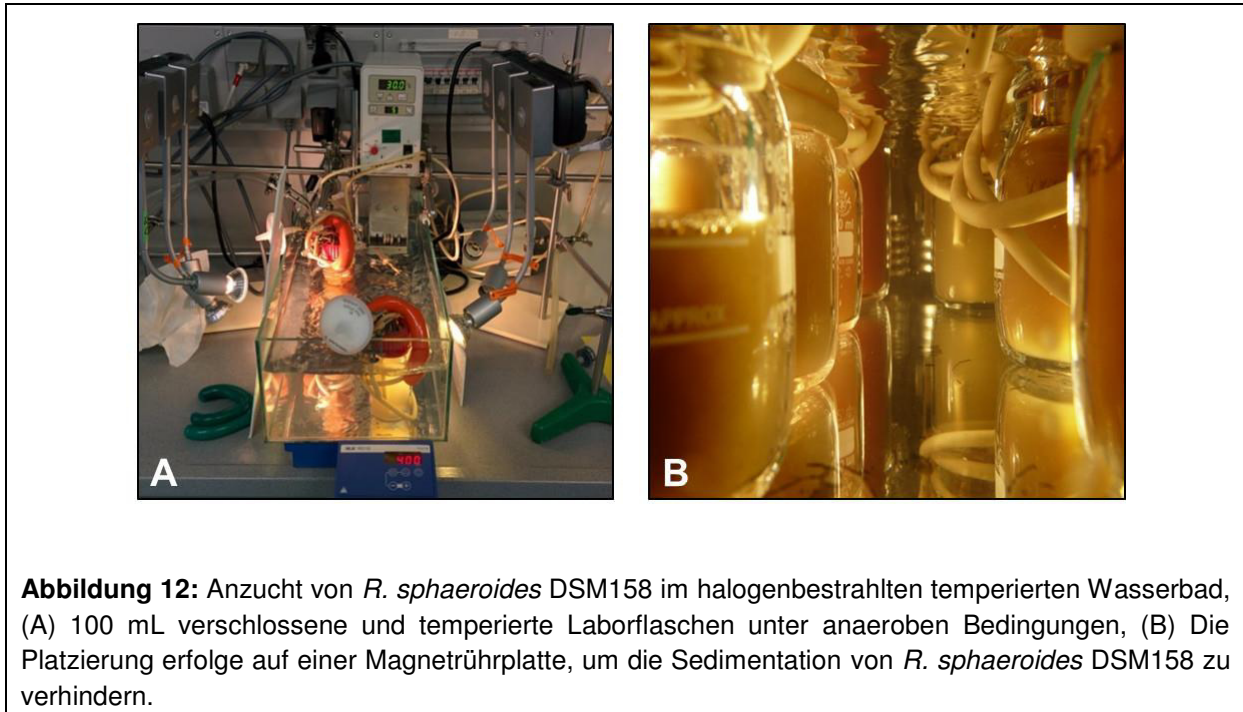
Die Lichtverfügbarkeit auf zellulärer Ebene wird maßgeblich durch die Bewegung der Zellen, die durch den mechanischen oder pneumatischen Leistungseintrag und das daraus resultierende Strömungsprofil im Reaktorvolumen induziert wird, bestimmt. Aus diesem Grund verspricht die Kombination aus empirischer Modellierung der Intensitätsverteilung und numerischer Simulation der Strömungsbedingungen mittels *Computational Fluid Dynamics* (CFD) ein verbessertes Prozessverständnis [51-54]. Die Kombination aus CFD und Lichtsimulation zur Bestimmung der zeitlich veränderlichen Bedingungen wurde erstmals von Perner-Nochta und Posten [52] demonstriert.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Mikroorganismus, Vorkultur und Inokulation

Rhodobacter sphaeroides DSM158 wurde als Lyophilisat von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Nach der Aktivierung der Bakterienkultur nach DSMZ-Anleitung wurden Bestandskulturen auf Kryo-Perlen angefertigt und bei -20 °C gelagert. Für die Anzucht einer Vorkultur wurden jeweils drei Kryo-Perlen in 50 mL Vorkulturmedium (VK) suspendiert (100 mL DURAN Laborflaschen). Die Laborflaschen wurden mit einer Gummidichtung und einem GL45 Deckel verschlossen. Ein Metalleinsatz mit zwei Ports zwischen Dichtung und Deckel wurde zur Schaffung sauerstofffreier Bedingungen ins Medium geführt. Im VK-Medium wurde durch Zugabe von 3 g L⁻¹ Glutaminsäure (Merck KGaA) und 0,3 g L⁻¹ D/L Milchsäure (Fluka) photoheterotrophes Wachstum von *R. sphaeroides* DSM158 stimuliert. Durch die hohe Stickstoffkonzentration wird die Transkription des Nitrogenase-Enzymsystems gehemmt, wodurch eine Wasserstoffproduktion und damit Überdruckbildung in den geschlossenen Laborflaschen verhindert wird. Die weiteren Medienbestandteile, d.h. Zusammensetzung der Salz-, Vitamin- und Spurenelemente-Lösung sind in Krujatz et al. [55] aufgelistet. Die Schaffung einer sauerstofffreien Atmosphäre in den Laborflaschen erfolgte über die Ports und angeschlossene Schläuche der L/S-Serie. Nach 10-minütigem Spülen der Flüssigphase mit Helium wurden die Laborflaschen gasdicht verschlossen und in einem temperierten Wasserbad bei 30 °C und 20 W m⁻² Halogenbestrahlung rührend für 72 h inkubiert (Abbildung 12). Vor dem Einsatz der Vorkultur für die Reaktorkultivierung, wurde sie jeweils dreimal für 48 h subkultiviert. Dazu wurden 5 mL Zellsuspension und 45 mL frisches VK-Medium vermischt und nach dem oben beschriebenen Protokoll behandelt. Anschließend wurden Zellen der späten exponentiellen Phase (nach 48 h)

zur Inokulation der Hauptkultur in einem Halogen-Photobioreaktor genutzt. Das Hauptkulturmedium (HK-Medium) unterschied sich in der Zusammensetzung lediglich in der Konzentration der Glutamin- ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) und D/L Milchsäure ($3,6 \text{ g L}^{-1}$).



Das hohe C:N-Verhältnis resultiert nach ca. 20 h Kultivierungsdauer in einer Stickstofflimitation, bei gleichzeitigem Überschuss an der Kohlenstoffquelle D/L Milchsäure, worauf die Transkription und Aktivität des Nitrogenase-Enzymsystems initiiert wurde.

2.2.2 Aufbau des Halogen-Photobioreaktors

Ein 1L-Applikon-Rührreaktor wurde mit drei 6-Blatt-Scheibenrührer (Durchmesser 45 mm) ausgestattet (Abbildung 13). Die Bestrahlung des zylindrisch transparenten Reaktorgefäßes erfolgte durch eine selbst-konstruierte Bestrahlungseinheit, die 12 dimmbare GU10 50 W Halogenstrahler (Halopar 1.6, Osram) mit einem Abstand von 5 cm zum Reaktionsgefäß umfasst (Abbildung 14). Über einen Hochleistungs-Wechselspannungssteller (NS2002, FG-Elektronik) konnte die elektrische Leistung stufenlos zwischen 0 W und 600 W eingestellt werden. Dies entsprach mittlerer Bestrahlungsstärken auf der Reaktoroberfläche von 0 W m^{-2} bis 2500 W m^{-2} .

2.2.3 Versuche im Satzbetrieb (batch-Kultivierung)

Der experimentelle Aufbau zur Kultivierung im Satzbetrieb unter Berücksichtigung der Stoffströme ist in Abbildung 15A dargestellt. Auf die Darstellung der verwendeten Sonden und

deren peripheren Geräte wurde in der Abbildung verzichtet. Die im Text angegebenen Nummerierungen finden sich in Abbildung 15A und 15B wieder.

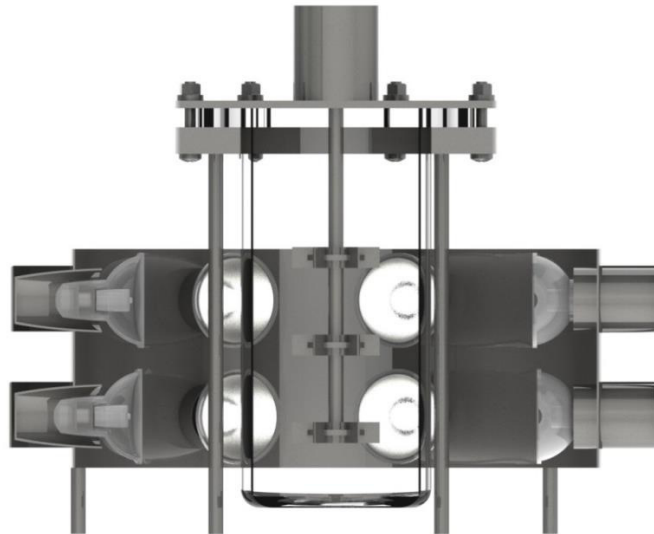


Abbildung 13: Gerenderte Schnittdarstellung (SOLIDWORKS 2012) des in dieser Studie verwendeten Halogen-Photobioreaktors. Der selbst konzipierte Bestrahlungsring fasst 12 symmetrisch angeordnete Halogenstrahler mit einer maximalen elektrischen Gesamtleistung von 600 W. Der mechanische Leistungseintrag erfolgt über drei 6-fach Scheibenrührer.

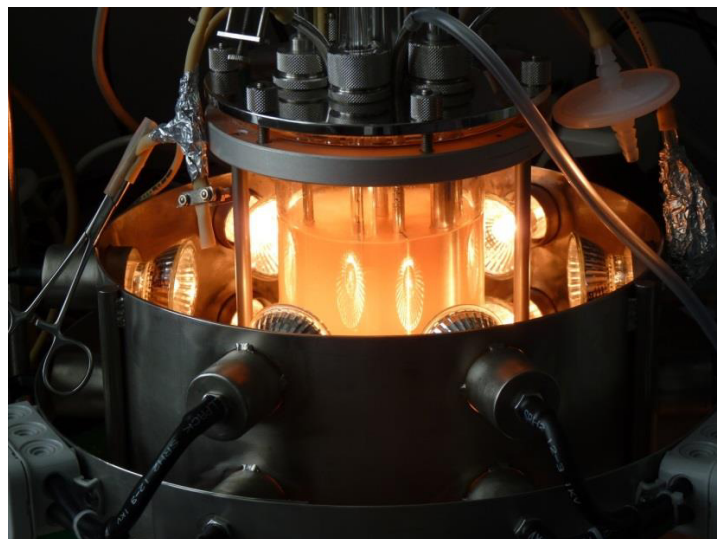
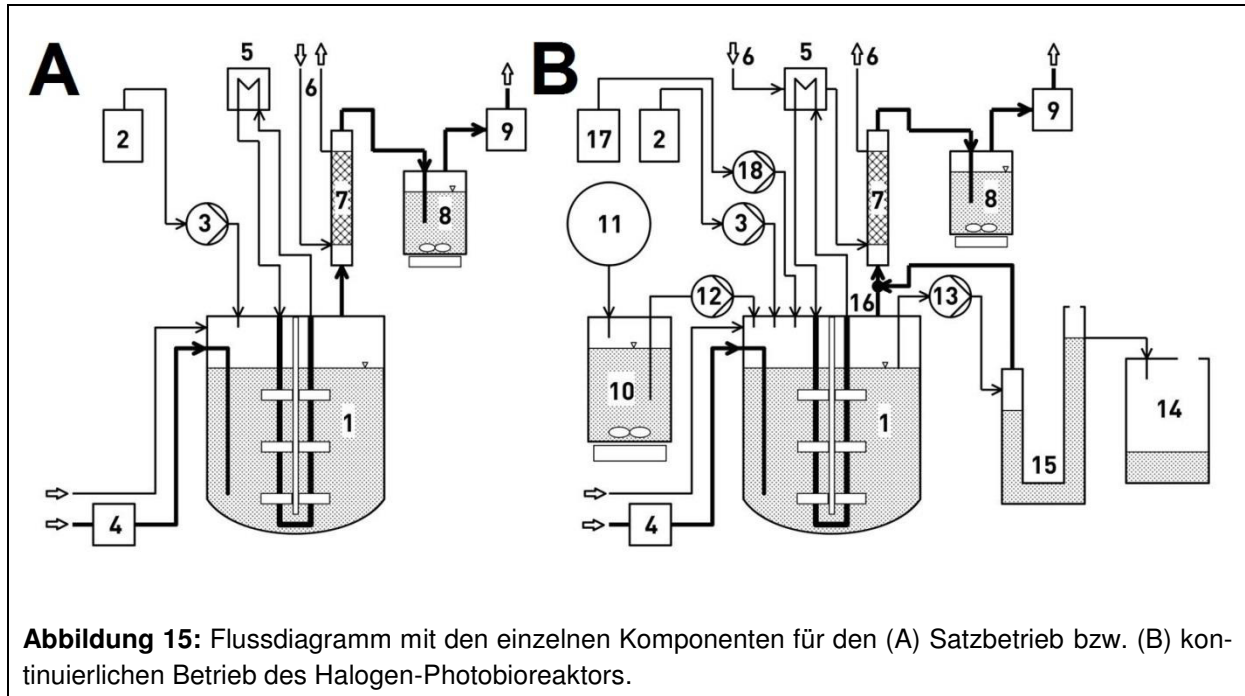


Abbildung 14: Darstellung des Halogen-Photobioreaktors im Satzbetrieb.

Alle Versuche im Satz- und kontinuierlichen Betrieb wurden in dem 1L-Halogen-Photobioreaktor (1) von Applikon Biotechnology durchgeführt.



Der mechanische Leistungseintrag wurde über drei installierte 6-Blatt-Scheibenrührer (Applikon®) realisiert und durch einen externen Regler (Applikon®, Stirrer Controller P100 ADI 1032) variiert. Des Weiteren wurden Sonden zur online Messung der Temperatur (Applikon®, PT100), der Sauerstoffsättigung (dO_2 , Mettler Toledo; 465-35-5C-P-K9) und des pH-Wertes (Applikon®, AppliSens) in den Edelstahldeckel integriert. Die Erfassung, Digitalisierung und Darstellung der Prozessdaten erfolgte über das Applikon Prozessleitsystem bestehend aus dem Biocontroller ADI 1030 (Applikon®) und der Software BioXpert (Applikon®).

Vor dem Autoklavieren wurde eine 2-Punkt-Kalibrierung der pH-Sonde (pH 4 und pH 7) durchgeführt und wie die dO_2 -Sonde in den dafür vorgesehenen Ports im Deckel integriert. Der Autoklavierprozess erfolgte bei 121 °C für 15 Minuten. 750 mL des autoklavierten VK-Mediums wurden in eine sterile 1000 mL Laborflasche gefüllt und über Glas-Sterilkupplungen pneumatisch in das abgekühlte zylindrische Reaktorgefäß (1) überführt. Bevor die Kalibrierung der dO_2 -Sonde durchgeführt werden konnte, wurde der Reaktor mit dem Biocontroller, der Stirrer Control Unit, dem Wärmeübertrager und dem Kühlwasserkreislauf verbunden und für mindestens zwei Stunden zum Einstellen konstanter Temperaturbedingungen unter Prozessbedingungen belassen. Während dieser Phase wurden 250 mL inokuliertes VK-Medium hergestellt ($OD_{680} = 0,4$) und in eine Laborflasche gefüllt, die ebenfalls Ports für den Flüssigkeitstransport besaß. Nach der 2-Punkt-Kalibrierung (Luft = 100 %, Helium = 0 %) der dO_2 -Sonde (4) wurden die 250 mL inokuliertes VK-Medium pneumatisch in das Reaktorgefäß überführt ($0,05 \text{ g L}^{-1} \approx OD_{680} 0,1$). Anschließend wurde der pH-Wert mittels einer Peristaltikpumpe (3, Cole-Parmer®; 7544-20) und 3 M Natriumhydroxid-Lösung (2) auf 7,0 eingestellt. Um den Eintrag von Sauerstoff in das Reaktorgefäß zu verrin-

gern, wurde während der Satzkultivierung keine pH-Regelung durchgeführt. Vor Beginn der Datenaufzeichnung wurde die Flüssigphase erneut mit Helium gespült (4, 1 L min⁻¹ für 15 Minuten, MFC, Bronkhorst High-Tech), um strikt anaerobe Bedingungen zu erhalten. Die Abführung der durch die Halogenstrahler eingetragenen Wärme erfolgte über die interne Kühlung (Thermostat Haake DC1 mit Haake K15 oder K30) (5), sodass durch das Prinzip von Heizen und Gegenkühlung eine konstante Medientemperatur von 30 °C ± 0,5 °C erzielt wurde. Ein Abgaskühler (6,7, Dimoth-Kühler, Glas, Länge: 45 cm) wurde zur Kondensation und Rückführung von Wasserdampf aus dem Produktgas eingesetzt. Die Kühlung erfolgte dabei durch den hauseigenen Kühlwasserkreislauf mit einem Betriebsdruck von maximal 0,5 bar. Nach der Trocknung des Produktgases erfolgte die Präzipitation des Kohlenstoffdioxidanteils in einer gesättigten Bariumhydroxidlösung (8), wobei das gasförmige Kohlenstoffdioxid zu wasserunlöslichem Bariumcarbonat reagierte.

Das Volumens des getrockneten und gereinigten Wasserstoffgases wurde über einen nachgeschalteten Gaszähler (9, MGC-1, Ritter, Bochum, Deutschland) ermittelt. Der verwendete Gaszähler erlaubte keine Einbindung in das vorhandene Prozessleitsystem. Aus diesem Grund wurden eine Webcam und die frei zugängliche Software *Timershot* zur Aufnahme des produzierten Gasvolumens in diskreten Zeitintervallen (20 Minuten) genutzt. Die Verbindung der einzelnen Reaktorkomponenten erfolgte mittels Masterflex-Kunststoffschläuchen der L/S-Serie. Für Flüssigkeiten wurden Schläuche des Typs „Norprene Food“ eingesetzt wohingegen „C-Flex“-Schläuche zum Transport von Gasen und Gasgemischen genutzt wurden. „C-Flex“-Schläuche weisen eine wesentlich geringere Gaspermeation auf und verhindern damit den Verlust von Produktgas aufgrund von Diffusionsvorgängen durch die Schläuche. In der Regel wurden die Versuche im Satzbetrieb für 48 h durchgeführt, in jedem Fall aber bis zur Beendigung der Gasproduktion.

2.2.4 Optimierung des volumetrischen Leistungseintrages P_0/V_L [kW m⁻³] und der mittleren Bestrahlungsstärke I_0 [W m⁻²] im Satzbetrieb

Für die Prozessführung im Satzbetrieb wurden die Prozessparameter der mittleren Bestrahlungsstärke I_0 (5 - 2500 W m⁻²) und des volumetrischen Leistungseintrages P_0/V_L (0,01 – 1,4 kW m⁻³) variiert und hinsichtlich der photofermentativen Wasserstoffproduktionsrate rH_2 [mL L⁻¹ h⁻¹] durch *R. sphaeroides* DSM158 optimiert. Der Leistungseintrag P_0 wurde bestimmt durch:

$$P_0 = N_0 \rho N^3 D^5 \quad (1)$$

wobei N_0 der Newtonzahl für drei 6-Blatt-Scheibenrührer entspricht [56], ρ die Dichte der Zellsuspension angibt (aufgrund der geringen Zelldichte wird die Dichte von Wasser bei 30 °C angenommen = 995.64 kg m⁻³), N die Rührerdrehzahl [s⁻¹] und D den Durchmesser des Rührers (0,045 m) definieren. Die erzielten Wasserstoffproduktionsraten (r_{H_2}) für die Variation von I_0 und P_0/V_L wurden mittels nichtlinearer Regression analysiert (Sigmaplot 11.0), um ein Optimum für die Variation der beiden Prozessparameter zu identifizieren.

2.2.5 Bestimmung der Rührer-Reynolds-Zahl (Re_R)

Unter der Annahme, dass bei geringen Zellkonzentrationen die Viskosität der Zellsuspension der Viskosität von Wasser gleichgesetzt werden kann, wurde die Rührer-Reynolds-Zahl wie folgt bestimmt:

$$Re_R = \frac{\rho * N * D^2}{\eta} \quad (2)$$

Dabei entspricht ρ der Dichte (995,65 kg m⁻³) und η der dynamischen Viskosität (0,0008 kg m⁻¹ s⁻¹) von Wasser bei 30 °C. Weiterhin fließen in die Formel die Rührerdrehzahl N [s⁻¹] und der Durchmesser des Rührers D (0,045 m) ein.

2.2.6 Versuche im kontinuierlichen Betrieb (Chemostat)

In Abbildung 15B ist ein erweitertes Flussdiagramm für die Chemostat-Kultivierung dargestellt. Der Versuchsaufbau wurde um einen mittels Magnetrührer durchmischten 20L-Vorratsbehälter (10, Nalgene®; Polypropylen) erweitert. Zur Kontrolle und Überwachung der Zulaufpumpe (12) wurde der Vorratsbehälter auf einer Waage platziert und der zeitliche Verlauf der Massenänderung aufgezeichnet. Um den Eintrag von Sauerstoff durch den Pumpvorgang zu unterbinden, wurde ein mit Helium gefüllter Gasbeutel (11) am Vorratsbehälter angebracht. Die Ablaufpumpe (13, Cole-Parmer®; 7544–20) sorgte über ein Edelstahlrohr (Innendurchmesser 4 mm), das durch den Reaktordeckel führte, für einen konstanten Füllstand im Reaktor. Der anschließende Gas-Flüssig-Separator (15) ermöglichte die Rezirkulation des Produktgases (16), das durch den Pumpvorgang aus dem Reaktorsystem entfernt wurde. Die abgeführte Fermentationsbrühe gelangte über einen Schlauch in einen Abfallbehälter (14). Der Aufbau und die Funktionsweise eines solchen Gas-Flüssig-Separators wurden durch Ray und Löser [57] beschrieben. Die pH-Regelung erfolgte über ein zusätzliches Vorratsgefäß für 3 M Schwefelsäure (17) und eine weitere Schlauchpumpe (18, Cole-Parmer®; 7544–20).

2.2.7 Kontinuierliche Kultivierung bei variierender Durchflussrate D [h^{-1}] und Rührer-Reynolds-Zahl Re_R

Die Inokulation des Halogen-Photobioreaktors erfolgte gemäß Kapitel 2.2.3. Die zu Beginn der Batchphase eingestellten Prozessparameter entsprachen pH-Wert von 7,3 bei einer Kultivierungstemperatur von $30\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, einem I_0 von 2250 W m^{-2} und einer Drehzahl von 550 rpm. Nach 18 h Kultivierung im Satzbetrieb wurden die Zu- und Ablaufpumpen eingeschaltet, um die Durchflussrate D [h^{-1}] zu variieren. Die Durchflussrate D [h^{-1}] ist definiert als das Verhältnis der Feedrate F [L h^{-1}] und dem Arbeitsvolumen V [L] des Halogen-Photobioreaktors:

$$D = \frac{F}{V} \quad (3)$$

Über die Feedrate F wurde die Durchflussrate D zwischen $0,023\text{ h}^{-1}$ und $0,146\text{ h}^{-1}$ variiert und deren Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration, die Konzentrationen der organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (D/L Milchsäure und Glutaminsäure) bzw. die Wasserstoffproduktionsrate bei einer konstanten mittleren Bestrahlungsstärke I_0 von 2250 W m^{-2} untersucht. Um ein Fließgleichgewicht zu gewährleisten, wurden vor der Analyse der Prozessparameter mindestens drei Volumenwechsel durchgeführt. Der Einfluss des Strömungszustandes im Halogen-Photobioreaktor auf r_{H_2} wurde im Fließgleichgewicht bei konstantem D von $0,096\text{ h}^{-1}$ und I_0 von 2250 W m^{-2} untersucht. Dazu wurde die Rührerdrehzahl im Bereich von 150 rpm ($\text{Re}_R = 6300$) bis 750 rpm ($\text{Re}_R = 31600$) variiert.

2.2.8 Bestimmung des Wasserstoffausbeute-Koeffizienten Y_{H_2}

Der Wasserstoffausbeute-Koeffizienten Y_{H_2} ist definiert als das Verhältnis des experimentell ermittelten Wasserstoffvolumens zum theoretischen Maximum an produziertem Wasserstoff basierend auf der Annahme, dass lediglich D/L Milchsäure als organischer Elektronendonator genutzt wird [58].

$$Y_{\text{H}_2} = \frac{\text{Volumen Wasserstoff}_{\text{experimentell}} [\text{mL}]}{\text{Volumen Wasserstoff}_{\text{theoretisch}} [\text{mL}]} \times 100 \quad (4)$$

2.2.9 Offline-Analytik

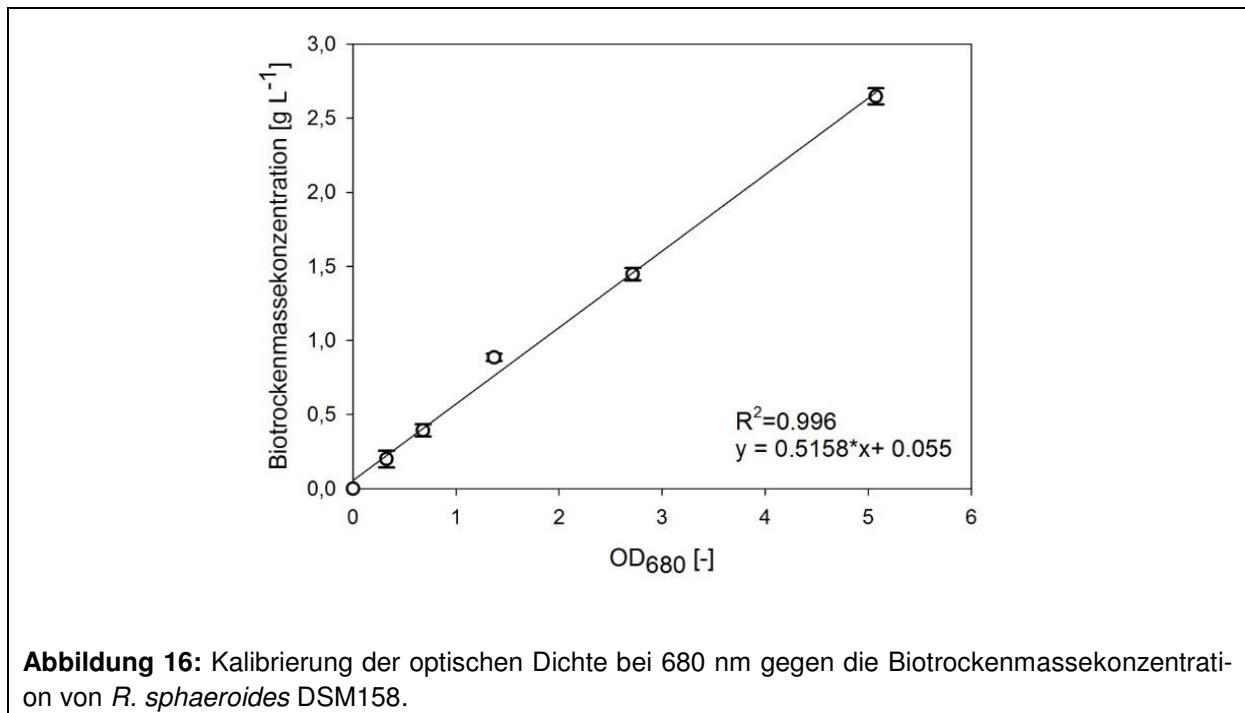
Die Entnahme von offline Proben aus der Flüssigphase des Reaktors erfolgte über ein Edelstahlrohr. Dazu wurde eine 5 mL Einwegspritze (B.Braun, Melsungen, Deutschland) auf einen Schlauch gesteckt und 2 mL Zellsuspension aufgezogen. Der Schlauch wurde sofort mit

einer Arterienklemme verschlossen und der Inhalt der Spritze verworfen (entspricht dem Totvolumen des Edelstahlrohres). Anschließend wurden erneut 2 mL Zellsuspension aufgezogen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.9.1 Kalibrierung OD_{680} vs. Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der optische Dichte der Zellsuspension erfolgte bei 680 nm mit Hilfe eines UV-VIS Spektralphotometers Helios beta (Thermo Fisher, Deutschland). Um Aussagen über die Biotrockenmassekonzentration zu gewinnen, wurde die OD_{680} im Bereich von 0 - 2,65 $g\ L^{-1}$ gegen die Biotrockenmassekonzentration kalibriert (Abbildung 16) und folgender lineare Zusammenhang erhalten:

$$\text{Biotrockenmasse} = 0,516 \times OD_{680} + 0,055 \quad (5)$$



2.2.9.2 Messungen organischer Säuren

Die Konzentration von D/L Milchsäure in den flüssigen Proben wurde mittels eines High-Performance-Liquid-Chromatographen (HPLC, Knauer), der mit einer Rezex-ROA-H+ Säule (300 * 7,8 mm) für organische Säure (Säulentemperatur = 65 °C) ausgestattet war, bestimmt. Vor der HPLC-Analyse wurde die Probe (ca. 1000 μL) durch einen 0,45 μm Spritzenfilter gereinigt. Als Elutionsmittel wurde 0,005 N Schwefelsäure verwendet und anschließend D/L Milchsäure über einen UV-Detektor (Knauer Wellchrom, UV K-2600) bei 210 nm detektiert.

Die Konzentration an Glutaminsäure wurde durch ein kommerzielles Enzym-Kit (r-biopharm, Darmstadt, Bestellnummer: 10139092035) gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

2.2.9.3 Analysen der Gaszusammensetzung

Die Zusammensetzung des Produktgases erfolgte an der Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik mit einem Mehrfachgasanalysator 8610C, der mit einem Molekularsieb, einer Siliziumoxid-Säule und einem TCD-Detektor (SRI Instruments Europe) ausgestattet war. Die zu untersuchende Probe wurde aus dem Abgasstrom des Halogen-Photobioreaktors mittels einer gasdichten Spritze (SGE) entnommen. 1 mL Probevolumen wurde manuell in die Probenschleife des Gasanalysators injiziert. Argon diente als Trägergas mit einer Flussrate von 21 mL min^{-1} und einem Druck von 2,55 bar. Die Säulentemperatur wurde schrittweise von 40 °C auf 100 °C erhöht (20 K min^{-1}). Abbildung 17 zeigt eine typische Produktgasanalyse. Neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als Hauptbestandteile des Gasmisches sind Spuren von Helium, das für das Spülen des Reaktorraumes genutzt wurde, zu erkennen. Die Anteile an Sauerstoff und Stickstoff sind Artefakte der manuellen Probenahme.

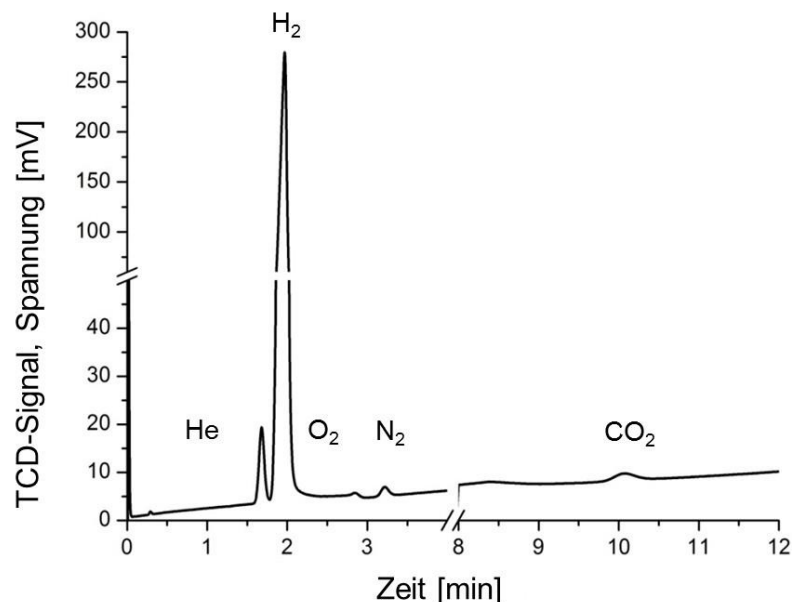


Abbildung 17: Offline-Gasanalyse des photofermentativ hergestellten Produktgases, welches sich aufgrund der stöchiometrischen Voraussetzungen aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zusammensetzt. Die Spurengase Helium und Luft sind Artefakte des Spülvorganges zu Beginn der Kultivierung und der Probenahme.

2.2.10 Aufnahme von Ganzzellabsorptionsspektren

Die Bestimmung des Absorptionsspektrums von *R. sphaeroides* DSM 158 erfolgte über die Software VISIONlite Scan und dem UV-VIS Spektralphotometers Helios beta im Wellenlängenbereich von 330 nm - 1100 nm (Spaltbreite von 1 nm). Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Biotrockenmassekonzentration der zu analysierenden Probe mit Medium auf jeweils 0,2 g L⁻¹ eingestellt.

2.2.11 Aufnahme von Emissionsspektren und Intensitäten

Die Aufnahme von Emissionsspektren verschiedener Licht- bzw. Strahlungsquellen wurde mittels eines USB-650 Spektrometers (Ocean Optics, Florida, USA) und der dazugehörigen Software SpectraViewer aufgenommen. Die Strahlungsintensität der Halogenstrahler wurde mit einem verkapselten Pyranometer (deka Sensor + Technologie, Teltow, Deutschland) bestimmt. Der 12 mm große Messkopf, der sensitiv für Strahlung im Wellenlängenbereich von 350 nm - 1100 nm ist, wurde bei diesem Gerät vom Transmitter getrennt und verkapselt. Damit ist es möglich den Messaufnehmer in Flüssigkeiten zu tauchen und Messungen im Realsystem vorzunehmen.

2.2.12 ZEMAX - Simulation

ZEMAX ist ein optisches Designprogramm, das für die Optimierung von optischen Systemen, u.a. Spiegeln und Linsen, entwickelt wurde. Die Software nutzt dafür die Methode des optischen „Ray Tracings“, d.h. die Verfolgung des Strahlenverlaufes basierend auf den vorgegebenen physikalischen Eigenschaften der simulierten Elemente. In dieser Studie wurde die Software genutzt, um qualitative Aussagen über die Intensitätsverteilung der Halogenstrahlung auf der Reaktoroberfläche zu gewinnen und eine simulierte durchschnittliche Bestrahlungsintensität (I_{ave}) zu ermitteln. Die geometrischen Abmessungen der Halogenstrahler wurden der ZEMAX Datenbank entnommen (<http://kb-en.radiant-Zemax.com>). Die 50 W elektrische Leistung der genutzten Halogenstrahler ergaben eine gemessene optische Leistung von 7,1 W \pm 0,1 W (Maestro Multimeter, Gentec). Im Simulationstool wurde die gemessene optische Leistung auf zwei gleichmäßig angeordnete Filamente im Halogenstrahler verteilt (Abbildung 18A und 18B). Die Geometrie des Reaktorgefäßes wurde gemäß seiner Abmessungen als Glaszylinder im Simulationstool implementiert. Die Platzierung eines 64-eckigen virtuellen Detektors (Abbildung 18E und 18D, gestreifter Bereich) erfolgte direkt hinter der Glasschicht des Reaktorgefäßes, um die Strahlungsintensität und deren Verteilung zu ermitteln. Schließlich wurden die Strahlenverläufe von 10⁶ virtuellen Strahlen simuliert. Die simulierte Intensitätsverteilung wurde experimentell validiert, indem die Intensität mit einem ver-

kapselten Pyranometer (Deka Sensor + Technologie, Teltow, Deutschland) an verschiedenen Positionen an der Innenseite des Glasreaktorgefäßes bestimmt wurde.

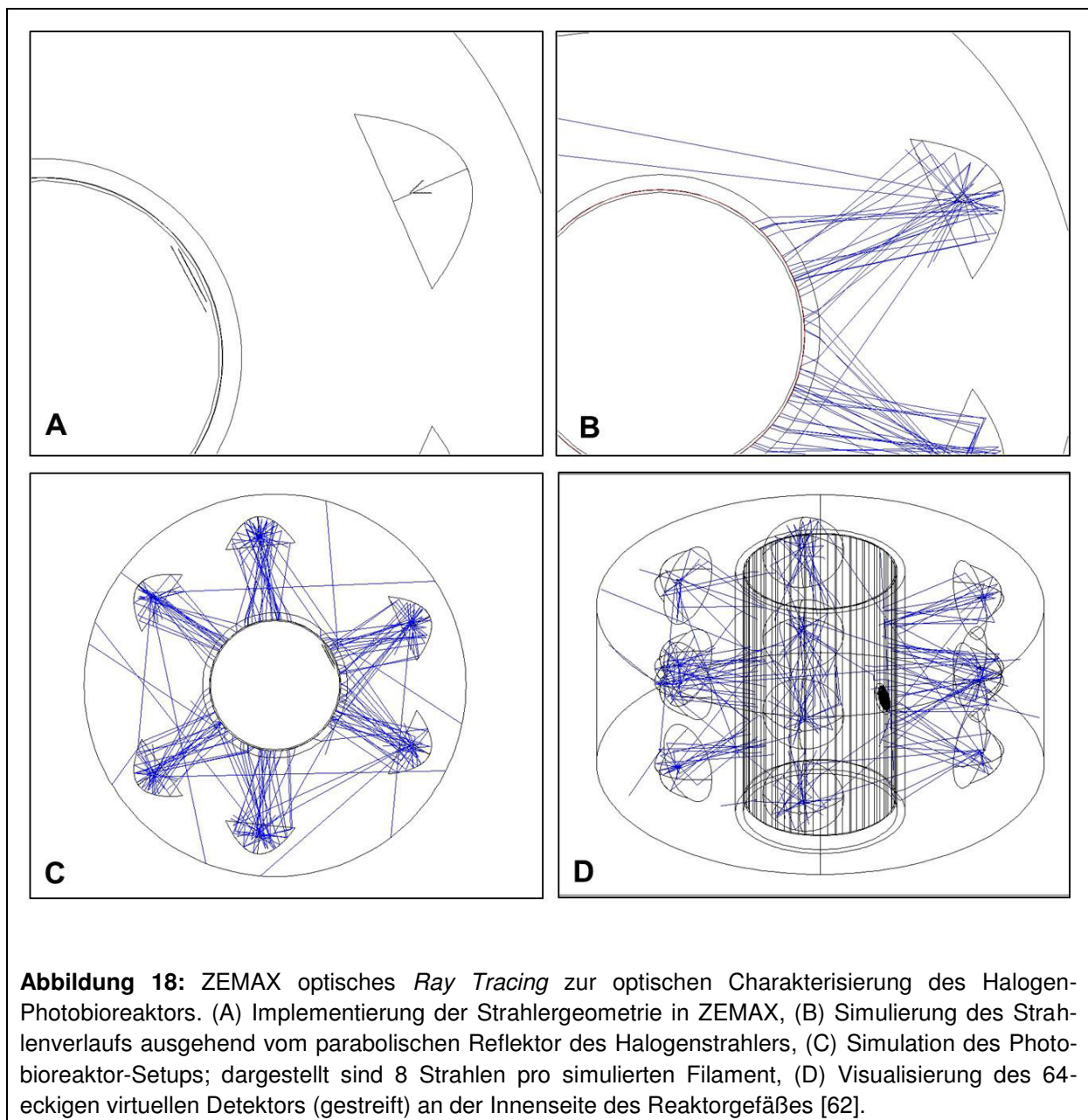


Abbildung 18: ZEMAX optisches *Ray Tracing* zur optischen Charakterisierung des Halogen-Photobioreaktors. (A) Implementierung der Strahlergeometrie in ZEMAX, (B) Simulation des Strahlenverlaufs ausgehend vom parabolischen Reflektor des Halogenstrahlers, (C) Simulation des Photobioreaktor-Setups; dargestellt sind 8 Strahlen pro simulierten Filament, (D) Visualisierung des 64-eckigen virtuellen Detektors (gestreift) an der Innenseite des Reaktorgefäßes [62].

2.2.13 Empirische Intensitätsmodellierung für ein zylindrisches Reaktorgefäß

Die Strahlungsintensität, die den phototrophen Organismen im Inneren des Halogen-Photobioreaktors zur Verfügung steht, wird durch eine Vielzahl physikalischer Effekte beeinflusst. Neben der Selbstabschattung der Organismen sind bei hohen Zelldichten vor allem Streuungs- und Absorptionseffekte für die Abschwächung der Strahlungsintensität über den Reaktorradius verantwortlich. Die individuellen Absorptionscharakteristika eines phototrophen Organismus hängen von seinen morphologischen Eigenschaften und den zellulären

Lichtsammelpigmenten ab [59]. Wissenschaftliche Ansätze zur Beschreibung dieser Vorgänge werden in deterministische und empirische Methoden unterschieden. Da deterministische Methoden zumeist eine Vielzahl an experimentell zu bestimmenden Parametern berücksichtigen, haben sich empirische Methoden als zweckmäßige Simulationstools erwiesen [60], um mit vertretbarem zeitlichem Aufwand ein Verständnis über die zu Grunde liegenden Bedingungen zu erhalten. Der einfachste empirische Ansatz zur Modellierung der Intensitätsabschwächung ist durch die Lambert-Beer-Korrelation gegeben. Da allerdings nur ein empirischer Parameter zur Beschreibung von Absorptionseffekten in diesem Modell genutzt wird, ist er für hohe Zelldichten, bei denen weitere physikalische Effekte auftreten, nicht mehr anwendbar. In dieser Arbeit wurde das empirische Modell von Suh und Lee [61] verwendet, welches drei empirische Parameter, die Lichtpfadlänge, die Absorption und die Streuung, berücksichtigt.

$$\frac{I}{I_0}(\text{BTM}, l) = \frac{R_0}{R} \exp \left[\frac{\varepsilon_m * l * \text{BTM}}{(K_c + \text{BTM})(K_1 + 1)} \right] \quad (6)$$

Die hyperbolische Gleichung beinhaltet die Biotrockenmassekonzentration (BTM) und die drei empirischen Parameter ε_m, K_c, K_1 , die für unterschiedliche Lichtpfadlängen experimentell bestimmt werden müssen. Die Parameter R_0 und R geben die Entfernungen zur Bioreaktorwandung mit der Intensität I_0 bzw. zu einem beliebigen Punkt im Bioreaktor mit der Intensität I an.

Das zylindrische Reaktorgefäß wird mit Hilfe eines Zylinderkoordinatensystems, dessen Ursprung im Schnittpunkt des Zylinderbodens mit der Rotationsachse liegt, und den dazugehörigen Zylinderkoordinaten r, φ, z beschrieben. Die Koordinaten der externen Strahlungsquellen werden mit r_L, φ_L, z_L dargestellt. Die Herleitung des weiteren Simulationsansatzes wird in Krujatz et al. [62] beschrieben. Um den Rechenaufwand zu minimieren, wird die Intensitätsverteilung in z -Orientierung als konstant angenommen ($I_0 = 2250 \text{ W m}^{-2}$). Dadurch erhält man eine vereinfachte Intensitätsverteilung, die in Realität nur an definierten Stellen in z -Ausrichtung auftritt, jedoch eine Orientierung für die Intensitätsverteilung im Reaktorsystem liefert.

Es ergibt sich für einen zufällig gewählten Punkt im zylindrischen Reaktorsystem die summierte Intensität der einzelnen Strahlungsquellen, die abhängig ist von der Entfernung der Strahlungsquelle vom Reaktorgefäß, der Verteilung der Intensität an der gekrümmten Reaktoroberfläche, der Selbstabschattung und der Absorption bzw. Streuung innerhalb der Zellsuspension:

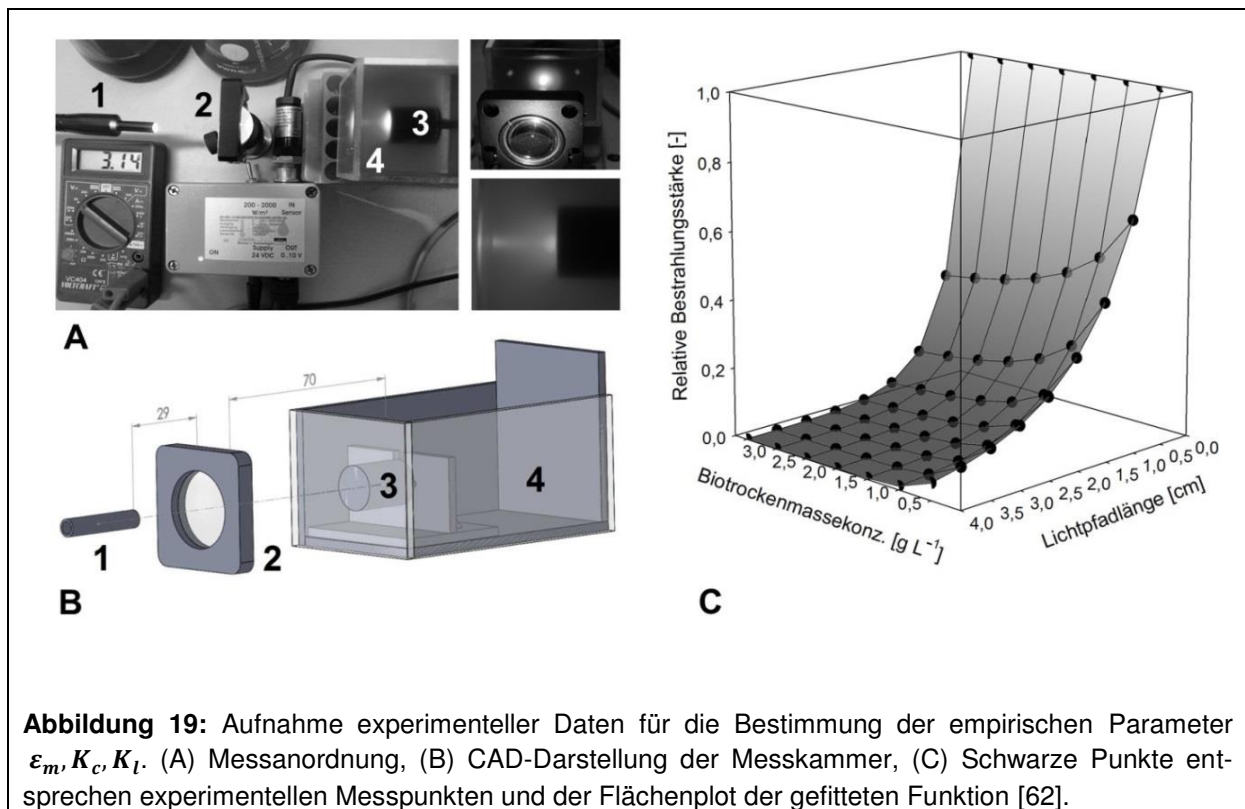
$$I(BTM, r, \varphi) = \sum_L^L \frac{I_0(\varphi_R)}{f_L(r, \varphi) + 1} * \exp \left[\frac{\varepsilon_m * BTM * R_L(r, \varphi) * (f_L(r, \varphi)^{-1} + 1)^{-1}}{(K_c + BTM)(K_l + [R_L(r, \varphi) * (f_L(r, \varphi)^{-1} + 1)^{-1}])} \right] \quad (7)$$

Alle Visualisierungen von Intensitätsverteilungen wurden mittels MATHCAD 15 durchgeführt.

2.2.14 Experimentelle Bestimmung der empirischen Parameter ε_m, K_c, K_l

Die Bestimmung der empirischen Modellparameter ist eine wichtige Grundlage für die Simulation von Intensitätsverteilungen innerhalb des Halogen-Photobioreaktors. In Abbildung 19 ist die Vorrichtung zur Ermittlung der Parameter in Abhängigkeit der Lichtpfadlänge und der Biotrockenmassekonzentration dargestellt. Da für diese Messungen eine Sammellinse (Thorlabs LA 1951) eingesetzt wurde, ergibt sich die Intensitätsabschwächungsbeziehung:

$$\frac{I}{I_0}(BTM, l) = \exp \left[\frac{\varepsilon_m * l * BTM}{(K_c + BTM)(K_l + l)} \right] \quad (8)$$



Die Messkammer verfügte über ein Füllvermögen von 130 mL. Die beiden Stirnseiten der Messkammer bestanden aus transparentem Polymethylmethacrylat und ermöglichten zum einen das Einstellen der Lichtpfadlänge über einen flexibel einstellbaren Schlitten und zum anderen die Ausrichtung des Lichtstrahls zum verkapselten Messkopf des Pyranometers. Die

BTM der Zellsuspension von *R. sphaeroides* DSM158 wurde im Bereich von 0,05 g L⁻¹ bis 3,0 g L⁻¹ variiert und die Strahlungsabschwächung für Lichtpfadlängen von bis zu 4,0 cm in 0,5 cm Intervallen aufgenommen. Zusätzlich erfolgte eine Messung in Wasser, um Streueffekte an den Messkammermaterialien zu berücksichtigen. Das Modell wurde an die experimentellen Daten mittels MATLAB 2012 gefittet, um die empirischen Parameter zu bestimmen.

2.2.15 COMSOL Multiphysics - *Computational Fluid Dynamics (CFD)*

Die kommerzielle Software COMSOL Multiphysics wurde genutzt, um die durch die drei installierten 6-Blatt-Scheiberrührer induzierten Strömungsprofile und -geschwindigkeiten zu simulieren. Für die Implementierung der Rührkesselreaktorgeometrie in die Software wurde das „*Rotating Machinery*“ Interface genutzt. Dabei wurde das Reaktorsystem nach Zhang [54] in zwei Bereiche, einen inneren rotierenden Bereich und einen äußeren stationären Bereich, unterteilt. Die beiden Bereiche wurden über eine Kontinuitätsbeziehung miteinander verknüpft. Um den Rechenaufwand zu reduzieren, wurde die Geometrie des Reaktorgefäßes vereinfacht. Anstelle des konischen Bodens wurde ein flacher Gefäßboden angenommen. Reaktoreinbauten, welche die Strömungssimulation erschweren, u.a. das Tauchrohr für das PT100, das Begasungsrohr oder das Probeentnahmerohr, wurden in der Simulation vernachlässigt. Die vereinfachte Geometrie ist in Abbildung 20 dargestellt.

Für die Netzstruktur wurden Standardeinstellung der Software COMSOL Multiphysics genutzt, wobei innerhalb des rotierenden Bereiches und an den installierten Strombrechern eine Maschenweite von 0,0015 m und in Bereichen, in denen kleine Änderungen der Strömung zu erwarten sind, 0,00388 m gewählt wurden. Für die gegebene Reaktorkonfiguration ergaben sich damit 298.914 zu berechnende Netzpunkte. Da die Kultur unter unbegasteten, anaeroben Bedingungen kultiviert wurde, konnte ein einphasiges wässriges System für die Strömungssimulation angenommen werden. Die Eigenschaften des Fluides ergaben sich somit wie folgt: $\rho = 1000 \text{ kg m}^{-3}$ und $\nu = 0,001 \text{ Pas}$. Um die Strömung zu beschreiben, wurde das k - ε Turbulenzmodell mit den Parametern der turbulenten kinetischen Energie k [$\text{m}^2 \text{ s}^{-2}$] und der Dissipationsrate ε [$\text{m}^2 \text{ s}^{-3}$], genutzt.

$$\frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_j}(\rho U_j k) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + P_k - \rho \varepsilon \quad (9)$$

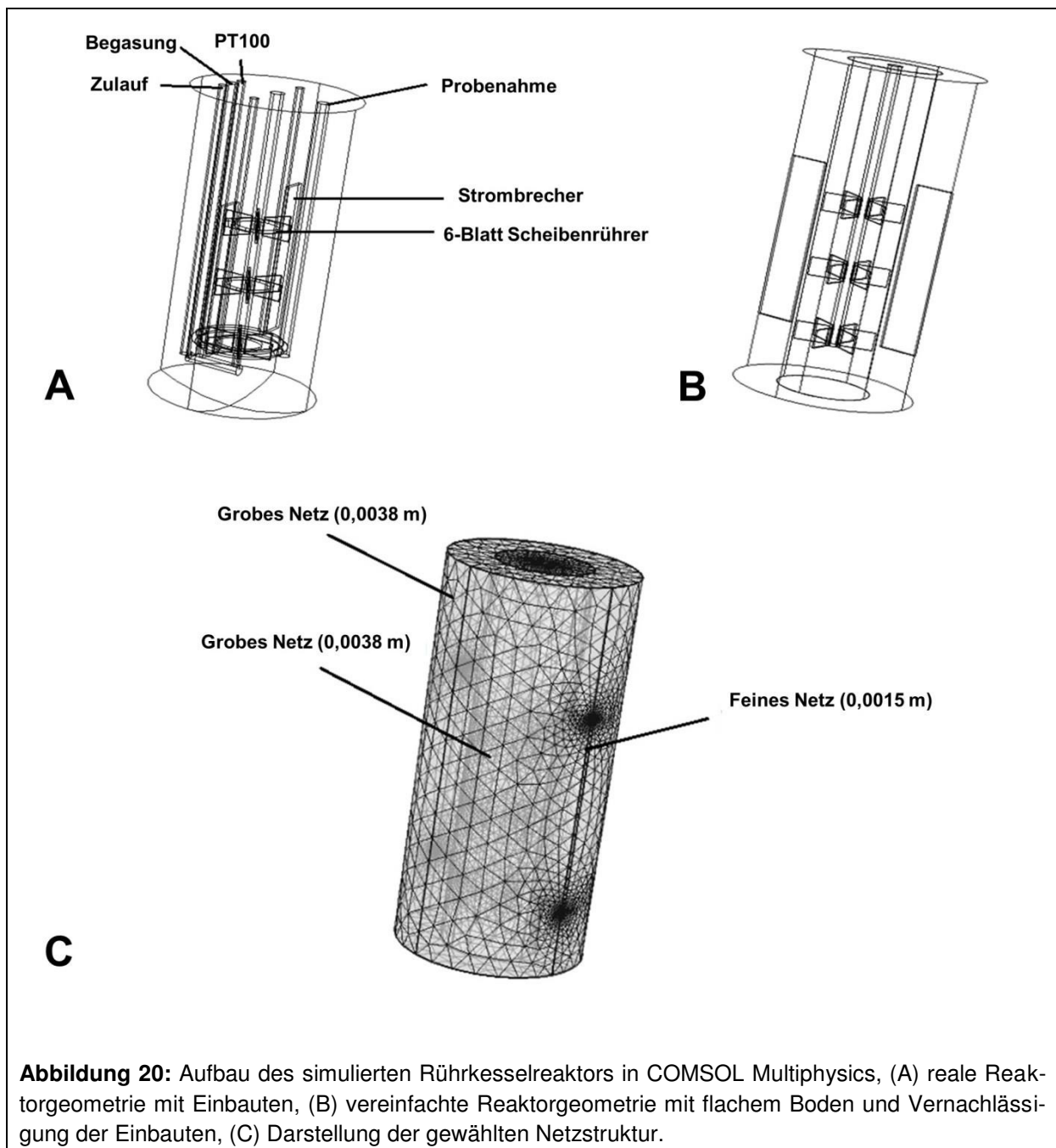
$$\frac{\partial(\rho \varepsilon)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_j}(\rho U_j \varepsilon) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + \frac{\varepsilon}{k} (C_{\varepsilon 1} P_k - C_{\varepsilon 2} \rho \varepsilon) \quad (10)$$

Das k-ε Turbulenzmodell ist ein robustes Standardmodell, das in den meisten CFD-Simulationstools implementiert ist. Die turbulente Viskosität μ_t wurde wie folgt modelliert:

$$\mu_t = C_\mu \rho \frac{k^2}{\varepsilon} \quad (11)$$

Für die Werte der Parameter C_μ , σ_k , σ_ε , $C_{\varepsilon 1}$ und $C_{\varepsilon 2}$ wurden die COMSOL Standardeinstellungen gewählt:

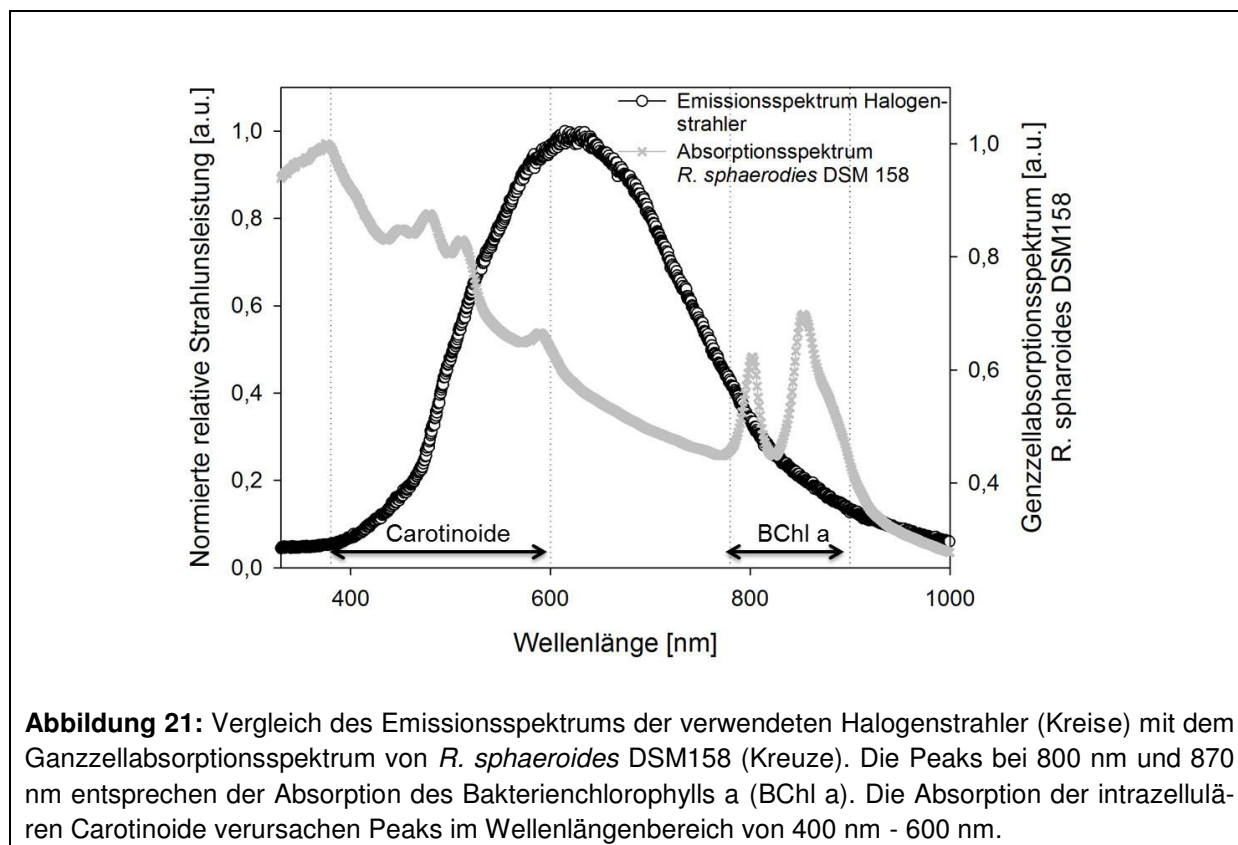
$$C_\mu = 0,09 \quad \sigma_k = 1,00 \quad \sigma_\varepsilon = 1,30 \quad C_{\varepsilon 1} = 1,44 \quad C_{\varepsilon 2} = 1,92$$



2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Optimierung des volumetrischen Leistungseintrages P_0/V_L [kW m^{-3}] und der mittleren Bestrahlungsstärke I_0 [W m^{-2}] im Satzbetrieb

Aus der Konformation der Bakterienchlorophyll a (BChl a) Moleküle im Lichtsammelkomplex von *R. sphaeroides* ist bekannt, dass PNS-Bakterien zwei Absorptionsmaxima im langwelligen nahinfraroten (NIR) Spektralbereich (800 nm und 870 nm) aufweisen (Abbildung 21). Das photoheterotrophe Wachstum und die Wasserstoffproduktion sind demnach von den spektralen Eigenschaften der Lichtquelle abhängig. In einem Großteil der veröffentlichten Studien wurden Halogenstrahler, aufgrund ihres NIR-Anteils, für die Bereitstellung der benötigten Strahlungsenergie während der Photofermentation verwendet [63].



Für die Produktion von molekularem Wasserstoff mittels PNS-Bakterien können sowohl „growing cells“ als auch „resting cells“ [64] eingesetzt werden. Bei „ruhenden“ Kulturen ist die photoheterotrophe Wachstumsphase von der Wasserstoffproduktionsphase durch den Wechsel des Kulturmediums zeitlich voneinander getrennt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Versuche mit „wachsenden Kulturen“ (= „growing cells“) durchgeführt, d.h. die Stickstofflimitierung wird während des Prozesses initiiert und nicht durch einen Medienwechsel hervorgerufen.

Innerhalb dieser Studie wurden P_0/V_L und I_0 in den Grenzen von $0,01 \text{ kW m}^{-3}$ - $1,4 \text{ kW m}^{-3}$ und 5 W m^{-2} - 2500 W m^{-2} variiert und hinsichtlich der erzielten Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}) und Biotrockenmassekonzentration (BTM) untersucht. Die selbst konzipierte Bestrahlungseinrichtung (siehe Kapitel 2.2.2) erlaubte dabei erstmals die experimentelle Untersuchung von mittleren Bestrahlungsintensitäten von bis zu 2500 W m^{-2} . Die in diesem Zusammenhang höchste bisher veröffentlichte durchschnittliche Intensität lag bei 1200 W m^{-2} [65]. Insgesamt wurden 12 Versuche im Satzbetrieb durchgeführt, deren Prozessparameter in Tabelle 3 gelistet sind.

In Abbildung 22 sind experimentelle Daten der kumulativen Wasserstoffproduktion (Abbildung 22B) und deren Rate r_{H_2} (Abbildung 22A) für ausgewählte Prozessbedingungen dargestellt, um den Einfluss der beiden Prozessparameter I_0 und P_0/V_L zu verdeutlichen.

Bei einem geringen I_0 von 5 W m^{-2} und hohem P_0/V_L von $1,4 \text{ kW m}^{-3}$ wurde keine Wasserstoffproduktion detektiert (Abbildung 22A, Bedingung 1). Die geringe Verfügbarkeit von PAR-Strahlung stellte hierbei den limitierenden Faktor dar und resultierte in einer geringen BTM von $0,21 \text{ g L}^{-1}$. Eine direkte zelluläre Reaktion auf die Schwachlicht-Verhältnisse konnte anhand der Betrachtung der Ganzzellabsorptionsspektren beobachtet werden. Nach 24 h Kultivierungsdauer wurde eine um 15 % gesteigerte BChl a-Absorption bei 800 nm und 870 nm bestimmt (Abbildung 22B, unteres Spektrum), d.h. die Bakterienzellen erhöhten die zelluläre Konzentration von Lichtsammelpigmenten, um eine effektivere Strahlungsausnutzung zu erzielen.

Gegenteilige Prozessbedingungen, d.h. ein geringer P_0/V_L von $0,01 \text{ kW m}^{-3}$ und ein hohes I_0 von 2500 W m^{-2} führten zu einer verstärkten Wasserstoffproduktion nach 8 h Kultivierungsdauer (Abbildung 21B, Bedingung 3). Der Wert für r_{H_2} erzielte nach 17 h sein Maximum von $157 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 20 h mit einer BTM von $2,4 \text{ g L}^{-1}$ und einem Wasserstoffausbeutekoeffizient Y_{H_2} von 28,8 % erreicht. Im Gegensatz zur Kultivierung bei geringem I_0 von 5 W m^{-2} zeigten die Absorptionswerte bei 800 nm und 870 nm unter der hohen mittleren Bestrahlungsintensität von 2500 W m^{-2} einen Rückgang um 44 % nach 24 h Kultivierungsdauer (Abbildung 22B, oberes Spektrum). Um den Einfluss der beiden Prozessparameter P_0/V_L und I_0 zu verdeutlichen, ist das Ergebnis eines weiteren Versuches bei 500 W m^{-2} und $0,72 \text{ kW m}^{-3}$ dargestellt, d.h. Prozessbedingungen, die jeweils etwa mittleren Werten der hier untersuchten Grenzen von P_0/V_L und I_0 entsprechen (Abbildung 22B, Bedingung 2). Die Wasserstoffproduktion setzte nach 10 h Kultivierungszeit ein, allerdings mit einer deutlich geringeren Rate im Vergleich zu der vorangegangenen Kultivierung bei 2500 W m^{-2} . Der Maximalwert für r_{H_2} erreichte $98 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer BTM von $1,78 \text{ g L}^{-1}$ und einem Y_{H_2} von 27,4 %. Trotz der geringen volumetrischen Pro-

duktionsraten stimmen die kumulativ gebildeten Mengen an Wasserstoff in beiden Experimenten überein.

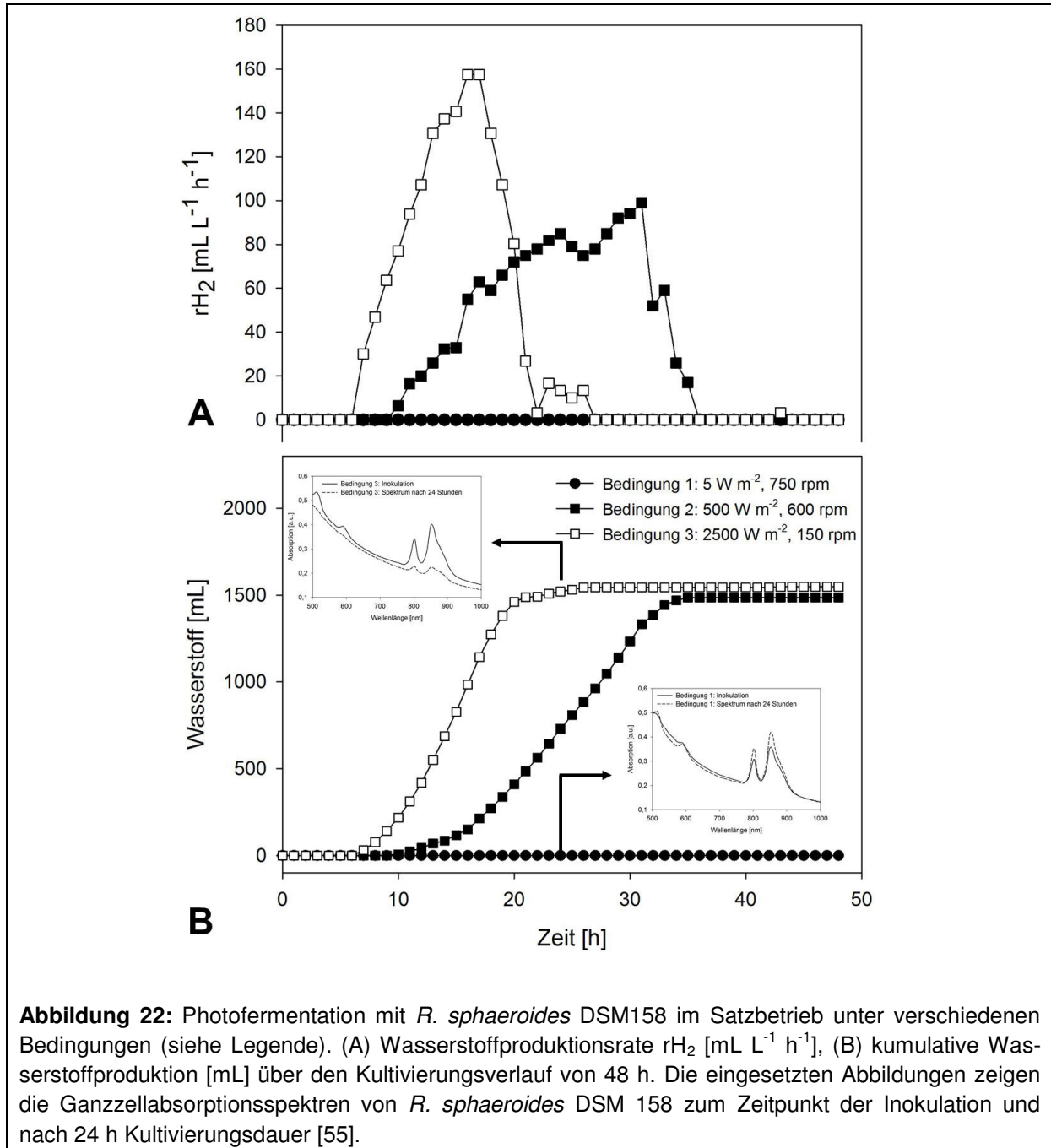
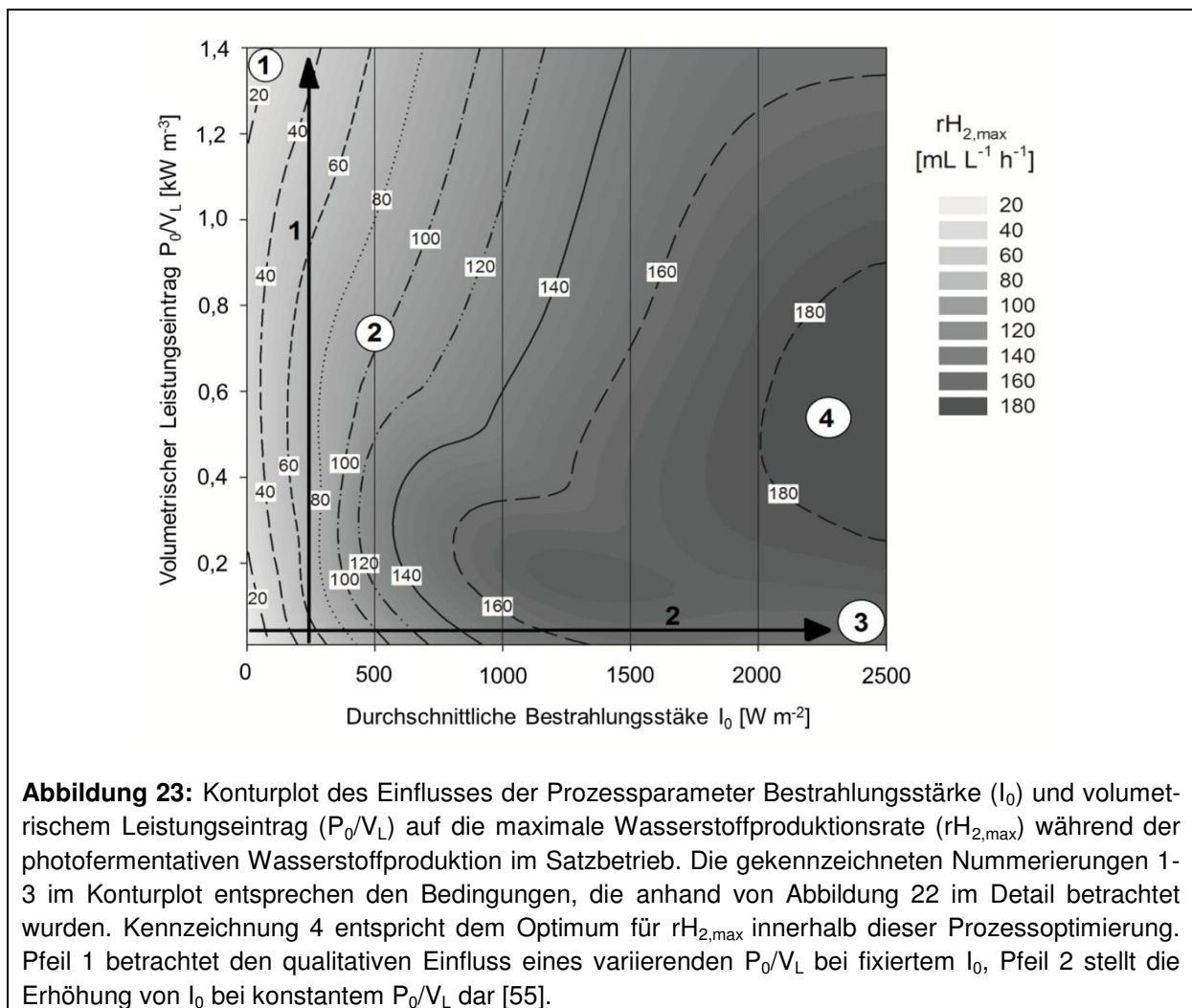


Abbildung 22: Photofermentation mit *R. sphaeroides* DSM158 im Satzbetrieb unter verschiedenen Bedingungen (siehe Legende). (A) Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} [mL L⁻¹ h⁻¹], (B) kumulative Wasserstoffproduktion [mL] über den Kultivierungsverlauf von 48 h. Die eingesetzten Abbildungen zeigen die Ganzzellabsorptionsspektren von *R. sphaeroides* DSM 158 zum Zeitpunkt der Inokulation und nach 24 h Kultivierungsdauer [55].

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse, die für die Variation des volumetrischen Leistungseintrages (P_0/V_L) und der mittleren Bestrahlungsintensität (I_0) hinsichtlich der photofermentativ gebildeten *R. sphaeroides* DSM 158 Biotrockenmassekonzentration [g L^{-1}], der Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} und der kumulativen Wasserstoffproduktion [mL_{H_2}] im Satzbetrieb erzielt wurden. Die grau hinterlegten Prozessbedingungen stellen die optimierten Parameter dar.

Rührer- geschwindig- keit [rpm]	Volumetrischer Leistungs- eintrag P_0/V_L [kW m^{-3}]	Mittlere Be- strahlungs- intensität I_0 [W m^{-2}]	Max. optische Dichte bei 680 nm [-]	Max. Biotrocken- masse [g L^{-1}]	Kumulatives H_2 Volumen [mL_{H_2}] nach 48 h	Max. H_2 - Produktions- rate $r_{\text{H}_2, \text{max}}$ [$\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$]	H_2 - Ertrag Y_{H_2} [%]
150	0,01	5	0,92	0,53	0	0	-
		500	3,00	1,60	1355	91,5	25,2
		2000	3,79	2,01	2667	162,5	49,7
		2500	4,55	2,40	1548	157	28,8
300	0,09	500	5,20	2,74	1402	124	26,1
		2000	4,28	2,26	2027	168	37,7
		2500	4,44	2,35	1792	169	33,4
600	0,72	500	3,35	1,78	1472	98	27,4
		2000	4,21	2,23	2178	187	40,6
750	1,4	5	0,31	0,21	0	0	-
		2000	4,24	2,24	1819	156	33,9
		2500	3,39	1,80	1812	156	33,7
550	0,55	2250	5,02	2,64	1763	195	32,8

Der Konturplot (Abbildung 23) gibt eine visuelle Zusammenfassung der Prozessoptimierung für die Parameter I_0 und P_0/V_L im Satzbetrieb. Anhand der eingezeichneten Isolinien und Grauabstufungen, welche den Wert der maximale Wasserstoffproduktionsrate unter diesen Bedingungen ($rH_{2,max}$) widerspiegeln, ist eine geringe Abhängigkeit von einem graduell steigenden P_0/V_L bei konstantem I_0 erkennbar (schwarzer Pfeil 1). Im Gegensatz dazu zeigte $rH_{2,max}$ eine lineare Abhängigkeit von einem steigenden I_0 im Bereich von 5 - 1000 $W m^{-2}$ bevor ein Sättigungsbereich (1000 - 2500 $W m^{-2}$) bei konstantem P_0/V_L erreicht wurde (schwarzer Pfeil 2). Die durch Nummerierung 1 bis 3 in Abbildung 23 gekennzeichneten Bereiche entsprechen den Bedingungen, die anhand von Abbildung 22 diskutiert wurden. Interessanterweise führten eine signifikante Erhöhung des Leistungseintrages um einen Faktor von 140 und die dadurch erhoffte bessere zelluläre Strahlungsverfügbarkeit nicht zu einer Steigerung von $rH_{2,max}$. Im Umkehrschluss ermöglicht dies jedoch, den Prozess bei deutlich geringerem volumetrischem Leistungseintrag zu betreiben ohne signifikante Produktverluste zu verzeichnen. Durch die nichtlineare Regression der erzielten maximalen Wasserstoffproduktionsrate wurden optimale Bedingungen im Satzbetrieb für ein I_0 von 2250 $W m^{-2}$ und ein P_0/V_L von 0,55 $kW m^{-3}$ ermittelt (Kennzeichnung 4 in Abbildung 23).



Für diese Prozessbedingungen wurde der Kultivierungsverlauf im Satzbetrieb detailliert untersucht (Abbildung 24). Die Temperatur wurde auf $30 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ geregelt und der Sauerstoffgehalt im Bioreaktor auf 0 % eingestellt. Kim et al. [66] zeigten, dass eine optimale Nitrogenaseaktivität bei einem pH Wert von 7,0 - 7,5 gewährleistet ist.

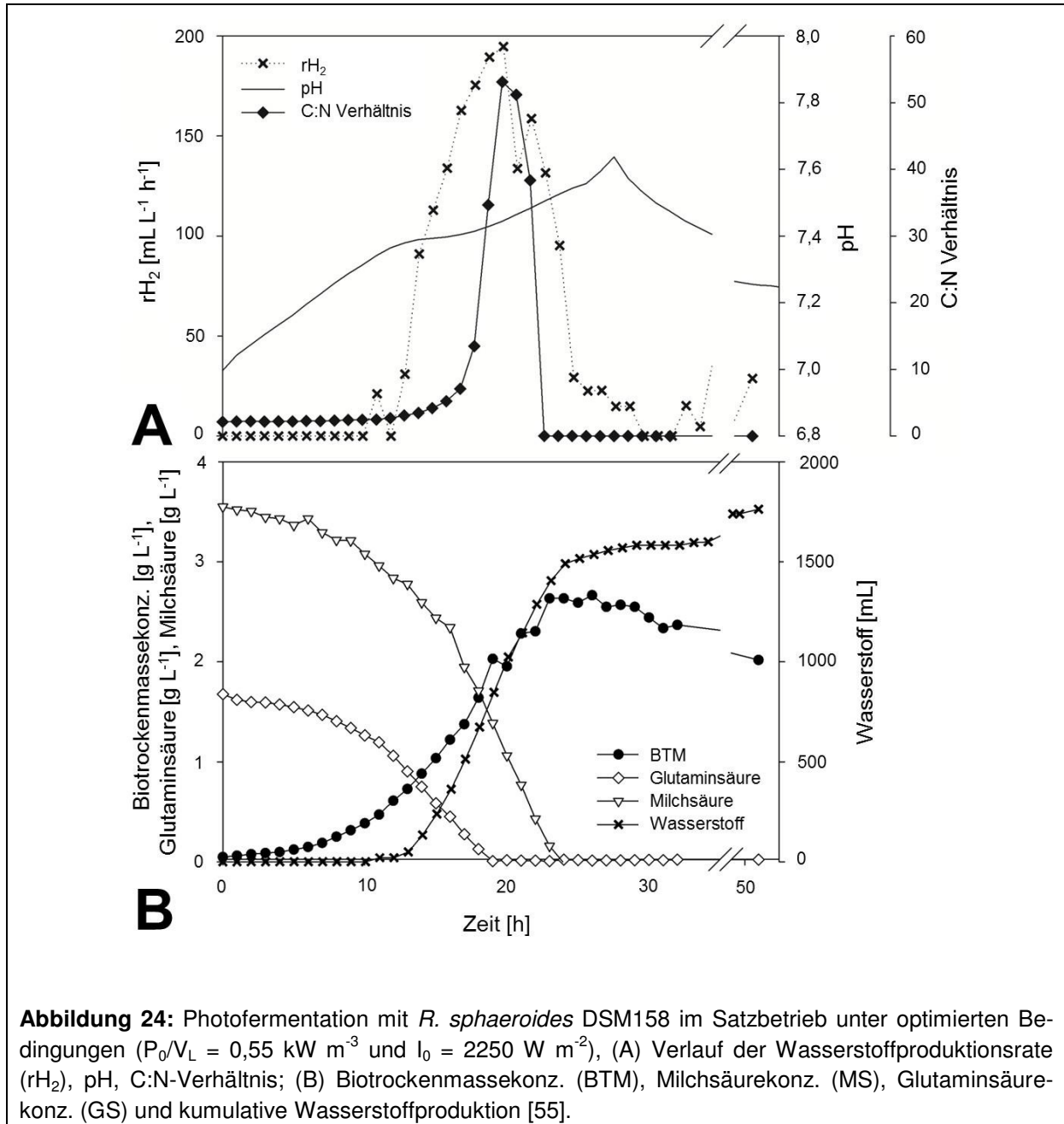


Abbildung 24: Photofermentation mit *R. sphaeroides* DSM158 im Satzbetrieb unter optimierten Bedingungen ($P_0/V_L = 0,55 \text{ kW m}^{-3}$ und $I_0 = 2250 \text{ W m}^{-2}$), (A) Verlauf der Wasserstoffproduktionsrate (rH_2), pH, C:N-Verhältnis; (B) Biotrockenmassekonz. (BTM), Milchsäurekonz. (MS), Glutaminsäurekonz. (GS) und kumulative Wasserstoffproduktion [55].

Durch den metabolischen Verbrauch von Glutamin- und Milchsäure stieg der initiale pH-Wert von 7,0 im Kultivierungsverlauf auf ein Maximum von 7,64 nach 27 h Kultivierung und sank bis zum Ende der Kultivierung auf 7,24. Die pH-Bedingungen im Halogen-Photobioreaktor ermöglichten damit eine effiziente katalytische Nitrogenaseaktivität. Die Stickstoffquelle Glutaminsäure und der organische Elektronendonator Milchsäure wurden zeitgleich metabolisch verwertet, wodurch sich ein dynamisch veränderndes C:N-Verhältnis im Halogen-

Photobioreaktor einstellte. Die erste Detektion von produziertem Wasserstoffgas erfolgte nach 11 h bei einem C:N-Verhältnis von 2,5. Die Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} und das C:N-Verhältnis steigerten sich im weiteren Kultivierungsverlauf linear und erreichten nach 20 h ihre Maxima von 50 (C:N-Verhältnis) und $195 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (r_{H_2}). Dies entspricht der höchsten bisher publizierten photofermentativ erzielten Wasserstoffproduktionsrate im Satzbetrieb für einen *R. sphaeroides* Stamm (vergleiche Tabelle 4). Die offline Produktgasanalyse nach 20 h Kultivierungsdauer ergab einen Wasserstoffanteil von 95 %. Durch die Limitation der Stickstoffquelle Glutaminsäure nach 20 h verringerte sich die Wachstumsrate von *R. sphaeroides* DSM158 im Verlauf der folgenden vier Stunden und erreichte die stationäre Phase. Zu diesem Zeitpunkt war ebenfalls die im Medium befindliche Milchsäure vollständig metabolisch umgesetzt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der verfügbaren Konzentration an Glutaminsäure und r_{H_2} wird bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs von r_{H_2} deutlich, dessen Maximum ebenfalls nach 20 h Kultivierung erzielt wurde; dem Zeitpunkt an dem die Konzentration der Stickstoffquelle nahezu gegen null und das C:N-Verhältnis sein Maximum erreichte. Mit dem Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase, induziert durch die Stickstofflimitierung, wurde eine linear sinkende r_{H_2} beobachtet. Die weitere Kumulation von Wasserstoff im Zeitraum von 24 h bis 48 h Kultivierungsdauer wird vermutlich durch die Freisetzung organischer Komponenten aus lysierten Zellen begünstigt. Der Wasserstoffausbeutekoeffizient Y_{H_2} erreichte unter diesen Prozessbedingungen einen Wert von 32,8 %. In Tabelle 3 sind die erzielten Ergebnisse für die photofermentative H_2 -Produktion im Satzbetrieb für die BTM [g L^{-1}], die kumulative Wasserstoffproduktion [mLH_2] und Y_{H_2} [%] zusammengefasst.

Tabelle 4: Überblick über die photofermentative Wasserstoffproduktion mit verschiedenen *R. sphaeroides* Stämmen und Prozessbedingungen.

<i>R. sphaeroides</i> Stamm	Lichtquelle	Intensität	Elektronendonor	Prozessführung	Max. H ₂ -Produktionsrate rH ₂ [mL L ⁻¹ h ⁻¹]	Quelle
O.U.001	Halogen	200 W m ⁻²	Äpfelsäure (15mM)	Batch	12	[35]
O.U.001	-	200 W m ⁻²	Industrieabwässer+ Äpfelsäure	Repeated-batch	5	[40]
O.U.001	Halogen	277 W m ⁻²	Äpfelsäure (15 mM)	Batch	33	[67]
KD131	Halogen	0-400 W m ⁻²	Äpfelsäure (30 mM)	Batch	36,1*	[68]
O.U.001	-	940 µE	Äpfelsäure (15 mM)	Batch	6,9	[69]
ZX-5	Halogen	8000 lx	Äpfelsäure (30 mM)	Batch	165,9	[70]
O.U.001	Halogen	64 W m ⁻²	Äpfelsäure (15 mM)	Repeated-batch	41,9	[42]
S10	Halogen	10000 lx	Ölpalmenreste	Repeated-batch	27,7	[39]
ZX-5	Halogen	5000 lx	Äpfelsäure (30 mM)	Fed-batch	102,33	[41]
DSM158	Halogen	2250 W m ⁻²	Milchsäure (40 mM)	Batch	195	Diese Arbeit
DSM158	Halogen	2250 W m ⁻²	Milchsäure (40 mM)	Kontinuierlich	165	Diese Arbeit
RV	Halogen	5-15000 lx	Milchsäure (100 mM)	Kontinuierlich	62,5	[43]

*errechnet aus den experimentellen Daten von Eroglu und Melis [71]

In der Regel stellt die PAR-Strahlung die einzige Energiequelle für photobiotechnologische Prozesse dar. Die Versorgung der katalytisch aktiven Organismen mit Strahlungsenergie in Photobioreaktoren wird durch Absorption, Selbstabschattung bei hohen Zelldichten und lange Lichtpfadlängen, d.h. große Reaktorvolumina, limitiert. Aus diesem Grund ist es essentiell, alle Prozessparameter, die direkten Einfluss auf die Bewegung der Zellen im Volumen des Photobioreaktors haben, zu berücksichtigen. In dieser Studie wurde der volumetrische Leistungseintrag P_0/V_L , als Funktion der Rührergeschwindigkeit, und die mittlere Bestrahlungsstärke I_0 als Prozessparameter in Betracht gezogen. Bei einem geringen I_0 von 5 W m^{-2} konnte bei keinem der Versuche eine Wasserstoffproduktion detektiert werden. Da die Versorgung mit PAR-Strahlung direkt mit der lichtgetriebenen zellulären ATP-Synthese gekoppelt ist [72], resultieren die Schwachlicht-Bedingungen in einem geringen Niveau an verfügbaren intrazellulären ATP. Dadurch wird die ATP-abhängige Funktion der Nitrogenase gehemmt. Vergleichbare Beobachtungen wurden durch Uyar et al. [67] gemacht, die keine Wasserstoffproduktion während der Dunkelphase in zyklisch beleuchteten Kultivierungen von *R. sphaeroides* messen konnten. Im Gegensatz zu weiteren Veröffentlichungen unter Verwendung anderer *R. sphaeroides* Stämme [67, 73, 74] zeigte *R. sphaeroides* DSM158, der in dieser Arbeit verwendete Stamm, eine hohe Toleranz gegenüber hohen mittleren Bestrahlungsintensitäten bis 2500 W m^{-2} . Die Prozessoptimierung im Satzbetrieb für den etablierten Halogen-Photobioreaktor ergab eine optimierte maximale Wasserstoffproduktionsrate bei I_0 2250 W m^{-2} und P_0/V_L von $0,55 \text{ kW m}^{-3}$. Uyar et al. [67] und Androga et al. [73] bestimmten eine optimale Bestrahlungsintensität von 270 W m^{-2} bzw. 287 W m^{-2} für die photofermentative Wasserstoffproduktion mittels *R. sphaeroides* O.U.001 (DSM5864) bzw. *R. capsulatus* DSM1710. Wakayama und Miyake [74] führten ebenfalls Photofermentationen unter Bestrahlungsintensitäten von bis zu 1200 W m^{-2} durch.

Unter den in dieser Arbeit betrachteten hohen Bestrahlungsintensitäten wurden Wasserstoffausbeutekoeffizienten zwischen 33,4 % und 49,7 % bestimmt. Diese Ausbeutekoeffizienten sind signifikant niedriger als in der Literatur beschrieben. Tao et al. [75], Kim et al. [68], Li et al. [70] oder Li et al. [41] publizierten Y_{H_2} -Werte zwischen 69 % und 88 %. Im Vergleich zu diesen Autoren wurden in dieser Studie allerdings bis zu 40 % höhere Biotrockenmassekonzentrationen, unter Verwendung sehr ähnlicher Medienbestandteile, erzielt, weshalb von einer Abhängigkeit des Biomasseausbeutekoeffizienten von der Bestrahlungsstärke ausgegangen wird. Ein entscheidender Nachteil des Satzbetriebs ist, dass sich die Bedingungen für die Mikroorganismen zeitlich und lokal dynamisch im System verändern und damit nur geringe Aussagen über die Abhängigkeit einzelner Faktoren auf die Wasserstoffproduktion gemacht werden können. Beispielsweise wurden maximale r_{H_2} -Werte bei einem C:N-Verhältnis von 10 bis 50 im Satzbetrieb erzielt, d.h. eine Limitation der Stickstoffquelle ist notwendig. Allerdings führt der vollständige Verbrauch der Stickstoffquelle zur Verringerung

der Wachstumsrate und damit zur Verringerung der Wasserstoffproduktion der „wachsenden Kulturen“. Um diesbezüglich konkretere Aussagen über die optimalen Bedingungen zu machen, ist die Etablierung eines kontinuierlichen Verfahrens unumgänglich.

2.3.2 Überführung der optimierten Parameter in ein kontinuierliches Verfahren

Die Prozessoptimierung im Satzbetrieb offenbarte zwei wichtige Aspekte, die bei der Überführung des Prozesses in einen kontinuierlichen Betrieb berücksichtigt werden müssen. Ein hoher r_{H_2} -Wert wird bei einem hohen C:N-Verhältnis erreicht, wobei die Stickstoffquelle Glutaminsäure zwar limitierend wirken muss aber nicht vollständig verbraucht werden darf, weil diese einen direkten Einfluss auf die Wachstumsrate μ [h^{-1}] der *R. sphaeroides* DSM158 Kultur hat. Eine zweite Beobachtung ergab, dass die Wachstumsrate μ [h^{-1}] direkt mit dem erzielten r_{H_2} korreliert, d.h. exponentiell wachsende Kulturen zeigten eine höhere Produktionsrate als Kulturen in der stationären Wachstumsphase.

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass sich über den Zulauf von HK-Medium mit einer Durchflussrate D von ca. $0,1 h^{-1}$ ein konstantes C:N-Verhältnis von $22,5 \pm 6,3$ im Halogen-Photobioreaktor einstellt. Die im Satzbetrieb optimierten Prozessbedingungen wurden ebenfalls für die kontinuierliche Betriebsweise gewählt. Nach 18 h Kultivierungsdauer wurde durch das Einschalten der Zulauf- und Ablaufpumpen der Prozess vom Satzbetrieb auf ein kontinuierliches Verfahren geschaltet (Abbildung 25). Die Messung des Betriebsdrucks im Bioreaktor erfolgte online, um Aussagen über die Dichtigkeit und Langzeitperformance des Prozesses treffen zu können. Die Bildung des geringen Unterdruckes zu Beginn der Kultivierung ist ein Resultat der initialen Probenahme. Der Betriebsdruck stieg im Folgenden aufgrund der einsetzenden Wasserstoffproduktion in der Batchphase der Photofermentation kontinuierlich an. Nach dem Umschalten der Prozessführung (ca. 18 h), wurde ein kontinuierlicher Betriebsdruck von ca. 18 mbar über den kontinuierlichen Kultivierungsverlauf von ca. 160 h detektiert. Dieser Druck entspricht dem Arbeitsdruck des nachgeschalteten Gaszählers und belegt damit die Dichtigkeit des Reaktorsystems. Die Konzentrationen von Glutamin- und Milchsäure nach 18 h, dem Ende der Batchphase, lagen bei $0,15 g L^{-1}$ und $1,8 g L^{-1}$ (C:N = 12). Im Anschluss an die Batchphase (0 - 18 h) folgte eine Übergangsphase (18 - 80 h), in der sich die Fließgleichgewichtsbedingungen ausbildeten. Während dieser Phase stieg der Wert für r_{H_2} temporär auf ein Maximum von $214 mL L^{-1} h^{-1}$. Fließgleichgewichtsbedingungen wurden nach ca. 80 h erreicht und für die darauffolgenden 100 h Kultivierungsdauer aufrecht gehalten. In dieser Phase bestand eine konstant niedrige Konzentration an Glutaminsäure von $0,02 \pm 0,01 g L^{-1}$. Die Milchsäurekonzentration im Fließgleichgewicht ergab $0,51 \pm 0,07 g L^{-1}$. Unter diesen Bedingungen wurde eine konstante r_{H_2} von $165 \pm 6,2 mL L^{-1} h^{-1}$ erzielt.

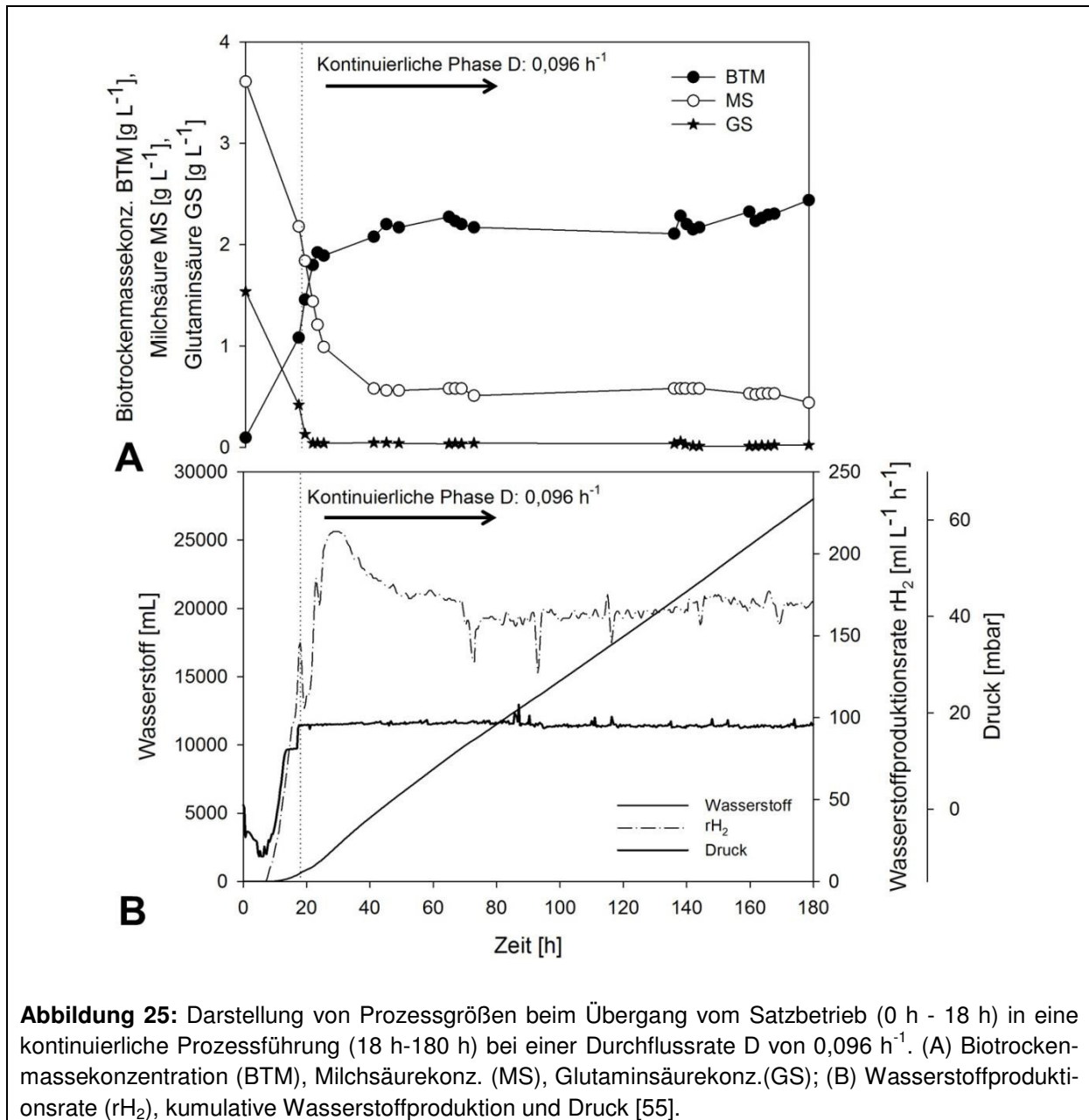


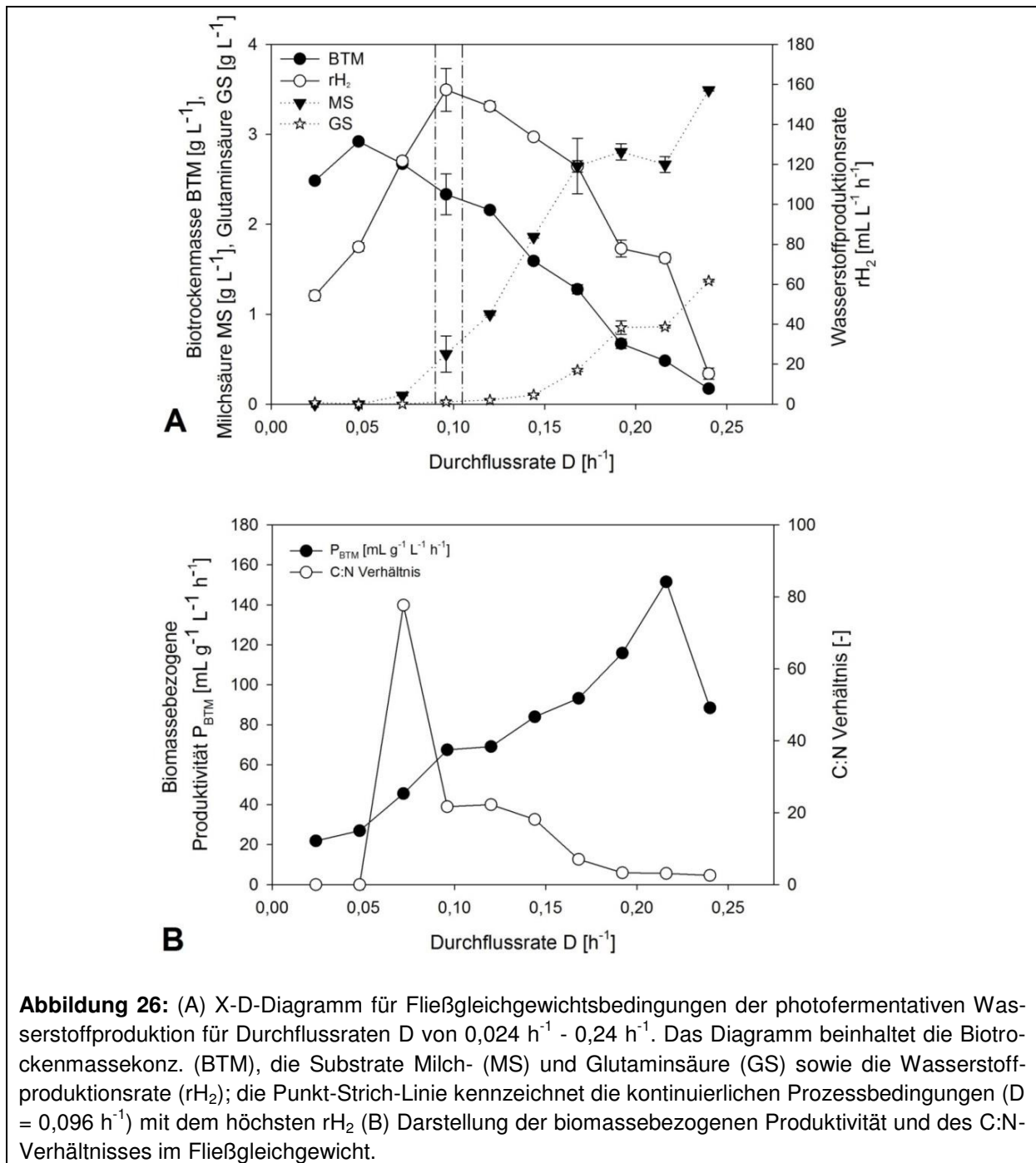
Abbildung 25: Darstellung von Prozessgrößen beim Übergang vom Satzbetrieb (0 h - 18 h) in eine kontinuierliche Prozessführung (18 h-180 h) bei einer Durchflussrate D von $0,096 \text{ h}^{-1}$. (A) Biotrockenmassekonzentration (BTM), Milchsäurekonz. (MS), Glutaminsäurekonz. (GS); (B) Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}), kumulative Wasserstoffproduktion und Druck [55].

Berücksichtigt man nur die 100 h anhaltende kontinuierliche Produktionsphase wurden von einer steady-state Biomassekonzentration von $2,35 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$ 16,5 L purer Wasserstoff produziert. Dies entspricht einem Y_{H_2} von 36,6 % und einer Produktivität von $3,96 \text{ L}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Produktivität unter diesen Prozessbedingungen ist 2,64-mal größer als Ergebnisse, die von Fascetti und Todini [43] für ein vergleichbares einstufiges Chemostatverfahren berichtet wurden.

2.3.3 X-D-Diagramm

Um den kontinuierlichen Wasserstoffproduktionsprozess weiter zu charakterisieren, wurde die Durchflussrate D [h^{-1}] in den Grenzen von $0,024 \text{ h}^{-1}$ bis $0,24 \text{ h}^{-1}$ variiert, um deren Einfluss auf die Fließgleichgewichtsbedingungen zu untersuchen. In Abbildung 26A sind die Ergeb-

nisse in Form eines X-D-Diagrammes zusammengefasst. Im Bereich geringer Durchflussraten ($0,024 \text{ h}^{-1} - 0,072 \text{ h}^{-1}$) befindet sich die Kultur stets unter limitierten Stickstoffbedingungen. Die zugeführte Glutaminsäure wurde in gleicher Rate durch die wachsende *R. sphaeroides* DSM158 Kultur metabolisch verwertet. Die Konzentration der Milchsäure erzielte ebenfalls eine geringe Fließgleichgewichtskonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Mit der Steigerung von D auf $0,096 \text{ h}^{-1}$ ging eine linear zunehmende r_{H_2} einher. Die Fließgleichgewichtsbedingungen bei einem D von $0,096 \text{ h}^{-1}$ ergaben ein C:N-Verhältnis von 21,66, eine BTM von $2,33 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ und ein r_{H_2} von $157,3 \pm 10,8 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Diese Prozessbedingungen entsprachen der maximalen Produktausbeute innerhalb der hier durchgeführten Variation der Durchflussrate.

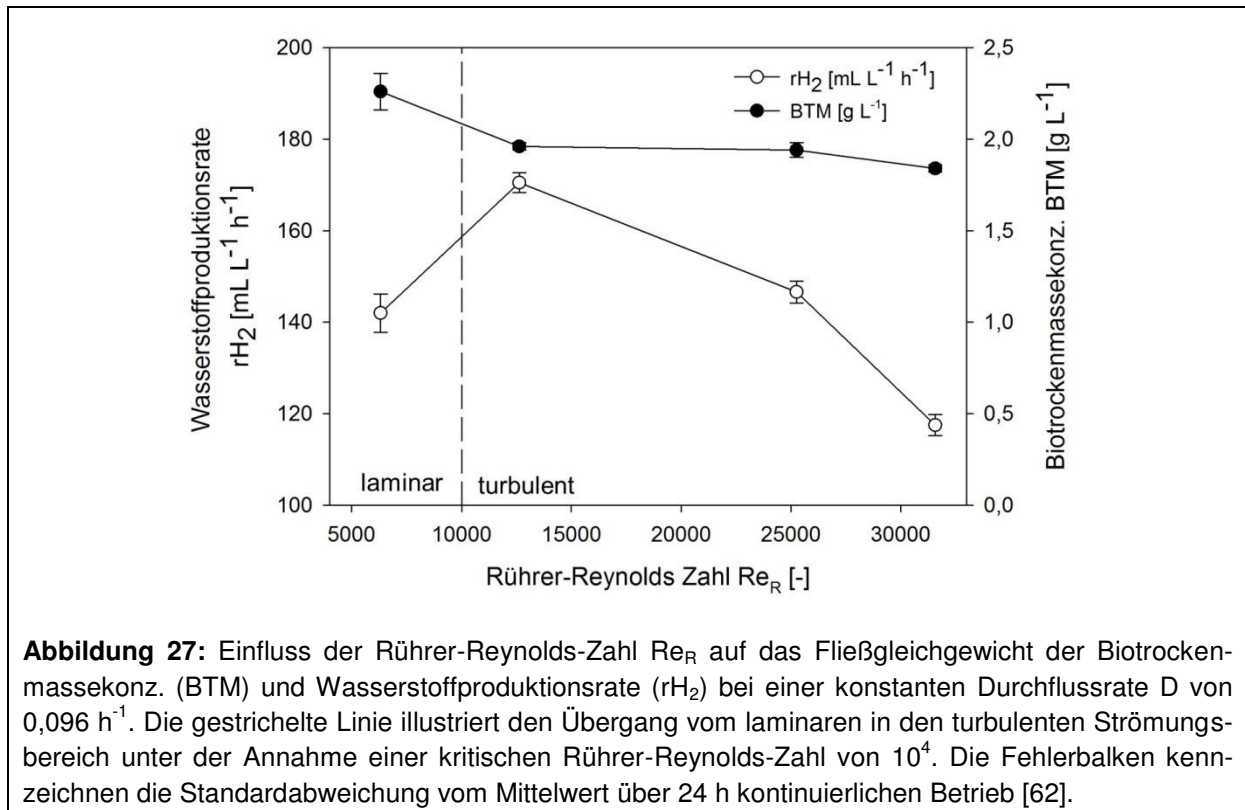


Aus einer weiteren Steigerung von D auf $0,24 \text{ h}^{-1}$ resultierte eine linear abnehmende BTM. Im Gegenzug stiegen die Konzentration der Substrate Glutamin- und Milchsäure mit zunehmenden D stetig an und erreichten bei einem D von $0,24 \text{ h}^{-1}$ mit Werten von $1,37 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ und $3,49 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ nahezu die Zulaufkonzentrationen von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ und $3,6 \text{ g L}^{-1}$. Durch die Abnahme des C:N-Verhältnisses von 21,66 ($D = 0,096 \text{ h}^{-1}$) auf ca. 3,0 (ab $D = 0,192 \text{ h}^{-1}$) und die sinkende Konzentration der katalytisch aktiven Biomassen sank ebenfalls $r\text{H}_2$ mit steigendem D signifikant ab. Die biomassebezogene Wasserstoffproduktivität P_{BTM} stieg mit steigendem D an (Abbildung 26B). Dies ist eine direkte Konsequenz der besseren zellulären Verfügbarkeit an PAR-Strahlung bei sinkender BTM und erlaubt die Schlussfolgerung, dass auch die volumetrischen Produktionsraten weiterhin gesteigert werden können, wenn es gelingt höhere Konzentrationen katalytisch aktiver Biomasse effizienter mit PAR-Strahlung zu versorgen. Da der zu optimierende Parameter die volumetrische Produktionsrate $r\text{H}_2$ darstellte, wurde in den nachfolgenden Untersuchungen die Durchflussrate D auf einen Wert von $0,096 \text{ h}^{-1}$ fixiert.

2.3.4 Variation von Re_R [-] bei konstanter Durchflussrate D [h^{-1}]

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Einfluss der Durchflussrate auf die Produktivität der kontinuierlich betriebenen Photofermentation untersucht. Die Versorgung der Bakterienkultur mit PAR-Strahlung wird neben der Intensität der einfallenden Strahlung I_0 und der Konzentration der katalytisch aktiven Biomasse maßgeblich durch die zelluläre Bewegung innerhalb des Reaktorvolumens bestimmt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Strömungszustandes, induziert durch die Drehgeschwindigkeit des installierten Rührers und in Form der Rührer-Reynolds-Zahl Re_R , auf die Produktivität bei konstanter Durchflussrate D von $0,096 \text{ h}^{-1}$ und Bestrahlungsintensität I_0 von 2250 W m^{-2} untersucht.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse für die steady-state BTM und $r\text{H}_2$ über Re_R dargestellt. Die höchste BTM von $2,26 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ wurde bei einer Rührerdrehzahl von 150 rpm ($\text{Re}_R = 6300$) erzielt. Für Re_R wird angenommen, dass der Übergang zum turbulenten Strömungsbereich bei einem Wert von 10^4 vollzogen ist. Durch die Erhöhung von Re_R auf 12600, wodurch der Übergang in den turbulenten Strömungsbereich realisiert wurde, sank die steady-state BTM um ca. 14% auf $1,96 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$. Durch eine weitere schrittweise Zunahme der Rührerdrehzahl wurde jedoch kein weiterer signifikanter Rückgang der katalytisch aktiven Biomasse beobachtet ($\text{BTM} = 1,84 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$). Im Gegensatz dazu zeigte $r\text{H}_2$ eine starke Abhängigkeit von den vorherrschenden Strömungsbedingungen. Durch die Verdopplung von Re_R von 6300 auf 12600 wurde zunächst ein Anstieg von $r\text{H}_2$ um 17 % auf ein Maximum von $170,5 \pm 2,2 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ verzeichnet. Durch die steigenden Fluidgeschwindigkeiten bei steigender Re_R wurde eine Reduzierung von $r\text{H}_2$ auf lediglich 69 % vom erzielten Maximalwert detektiert.



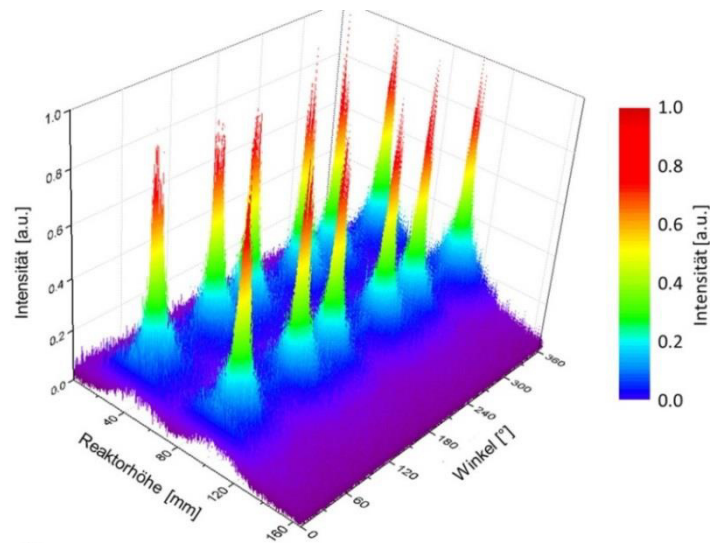
Aufgrund der konstant gehaltenen Durchflussrate D können steady-state Änderungen der Konzentrationen von Milch- und Glutaminsäure als Ursache für diesen Effekt ausgeschlossen werden. Da die katalytisch aktive BTM nicht wesentlich durch die eingestellten Strömungsbedingungen beeinflusst wurde, können die erzielten Ergebnisse für die Abnahme von r_{H_2} direkt auf die veränderte zelluläre Verfügbarkeit an PAR-Strahlung, der Energiequelle des Bioprozesses, zurückgeführt werden.

Um ausschließen zu können, dass der Rückgang von r_{H_2} mit steigender Re_R durch die wachsende Scherbelastung zu Stande kam, wurden Versuche im Satzbetrieb bei variierenden Rührerdrehzahlen durchgeführt und deren Einfluss auf die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} analysiert. Aus den experimentellen Daten, einzusehen in Krujatz et al. [62], ging hervor, dass kein negativer Einfluss auf μ_{max} mit steigender Re_R zu verzeichnen war. Generell sind Bakterien aufgrund ihrer geringen Zellgröße nicht scheranfällig, da ihre Größenordnung deutlich unter der Mikroskala der Turbulenz, vor allem in Rührkesselreaktoren, liegt [76].

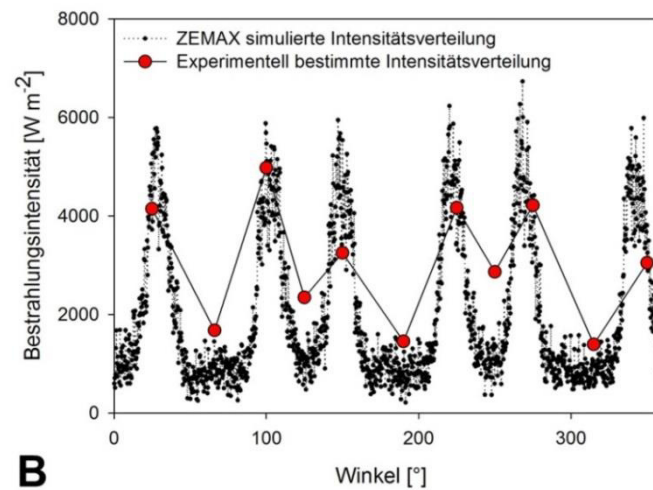
Um ein Verständnis über die zeitlich veränderlichen Bedingungen für die Zellen in dem Halo-gen-Photobioreaktor zu erhalten, wurde eine Reihe von Simulationsmethoden verwendet, deren Ergebnisse in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert werden.

2.3.5 Optische *Ray Tracing* Simulation

Das optische Designprogramm ZEMAX wurde genutzt, um die Verteilung der Strahlungsintensität, ausgehend von genutzten Halogenstrahlern, und eine simulierte mittlere Bestrahlungsintensität I_{ave} an der Reaktoroberfläche zu berechnen. Dies ist zugleich das erste Mal, dass ein extern bestrahlter Photobioreaktor (PBR) mittels optischer *Ray Tracing* Simulation charakterisiert wurde. Durch die Simulation des Strahlenverlaufes konnte festgestellt werden, dass 75,8 % der emittierten Strahlen die transparente Glasreaktorwand passieren und somit der bakteriellen Kultur als Energiequelle zur Verfügung stehen.



A



B

Abbildung 28: (A) ZEMAX simulierte Strahlungsintensitätsverteilung am virtuellen Detektor nach Passage der transparenten Bioreaktorwand; (B) Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Intensitätswerte bei einer Bioreaktorhöhe von 80 mm.

Trotz der geringen Distanz zwischen den Strahlungsquellen und der PBR-Oberfläche von lediglich 5 cm verfehlten 24,2 % der simulierten Strahlen die PBR-Oberfläche oder wurden aufgrund optischer Effekte an dieser reflektiert. Unter der Annahme, dass die 12 um den PBR angeordneten Strahlungsquellen eine optische Leistung von 85,2 W (7,1 W pro Strahler) zur Verfügung stellen, wurde eine durchschnittliche Strahlungsintensität I_{ave} auf der PBR-Oberfläche von 1339 W m^{-2} durch ZEMAX ermittelt (Abbildung 28A). Dieser theoretische I_{ave} Wert konnte durch experimentelle Messungen mit einem verkapselten Pyranometer an der Innenseite des Glasgefäßes validiert werden. Der Vergleich zwischen theoretischer und experimenteller Intensitätsverteilung auf der Innenseite der PBR-Oberfläche ist in Abbildung 28B dargestellt. Aufgrund der Geometrie des Pyranometer-Messkopfes (Durchmesser 12 mm) weisen die experimentellen Daten eine deutlich geringere Auflösung auf. Der lokale Verlauf der Intensitätsverteilung über den Umfang des zylindrischen Reaktorgefäßes wurde durch die Simulation in Übereinstimmung wiedergegeben. Nichtsdestotrotz wurden Zwischenbereiche, d.h. Zonen zwischen den einzelnen Strahlungsquellen, in der Simulation signifikant unterbewertet, wodurch die gemittelten Werte für I_{ave} (1339 W m^{-2} , schwarzer Graph) deutlich vom experimentell bestimmten Wert (2250 W m^{-2} , roter Graph) abweicht.

Die Abweichungen der Simulation von den gemessenen Werten werden vor allem durch die Annahmen beim Design der Strahlungsquellen in dem Simulationstool hervorgerufen. Die geometrische Anordnung der beiden Wolframdrähte in dem parabolischen Reflektor hat dabei einen großen Einfluss auf die resultierenden Strahlenverläufe. In Realität unterscheiden sich einzelne Strahlungsquellen bezüglich dieses Parameters, wodurch eine allgemeingültig Simulation eines solchen parabolischen Reflektors nicht möglich ist. Neben der Bestimmung der durchschnittlichen Intensitätsverteilung wurde die Simulation genutzt, um ein Verständnis über die Verteilung der Strahlungsintensität zu erlangen. Wie in Abbildung 28A zu erkennen, sind an den Positionen der 12 Halogenstrahler deutliche Peaks in den Strahlungsintensitäten zu erkennen. Unter der Annahme, dass die maximale Strahlungsintensität 100 % entspricht, schwankt die Strahlungsintensität in Abhängigkeit der Position auf der PBR-Oberfläche zwischen 10 % und 100 %. Dies verdeutlicht, dass neben der Intensitätsverteilung über das Volumen des Reaktors auch die Intensitätsverteilung auf der PBR-Oberfläche ein wichtiges Kriterium für die exakte Bestimmung der zellulären Verfügbarkeit an PAR-Strahlung darstellt.

Diese Studie ist eine der ersten, die das optische *Ray Tracing* für die Charakterisierung eines PBRs nutzt. Eine thematisch verwandte Arbeit stammt von Zijffers et al. [77], die diese Simulationsmethode für die Charakterisierung von Sonnenlichtkollektoren nutzten, um das gesammelte Licht schließlich einem Algenreaktor zuzuführen. Auch wenn der Simulationstool das Halogen-Photobioreaktor-Setup aufgrund der benannten Schwächen nicht im Detail wiedergeben kann, sind dennoch qualitative Untersuchungen zu auftretenden Intensitätsver-

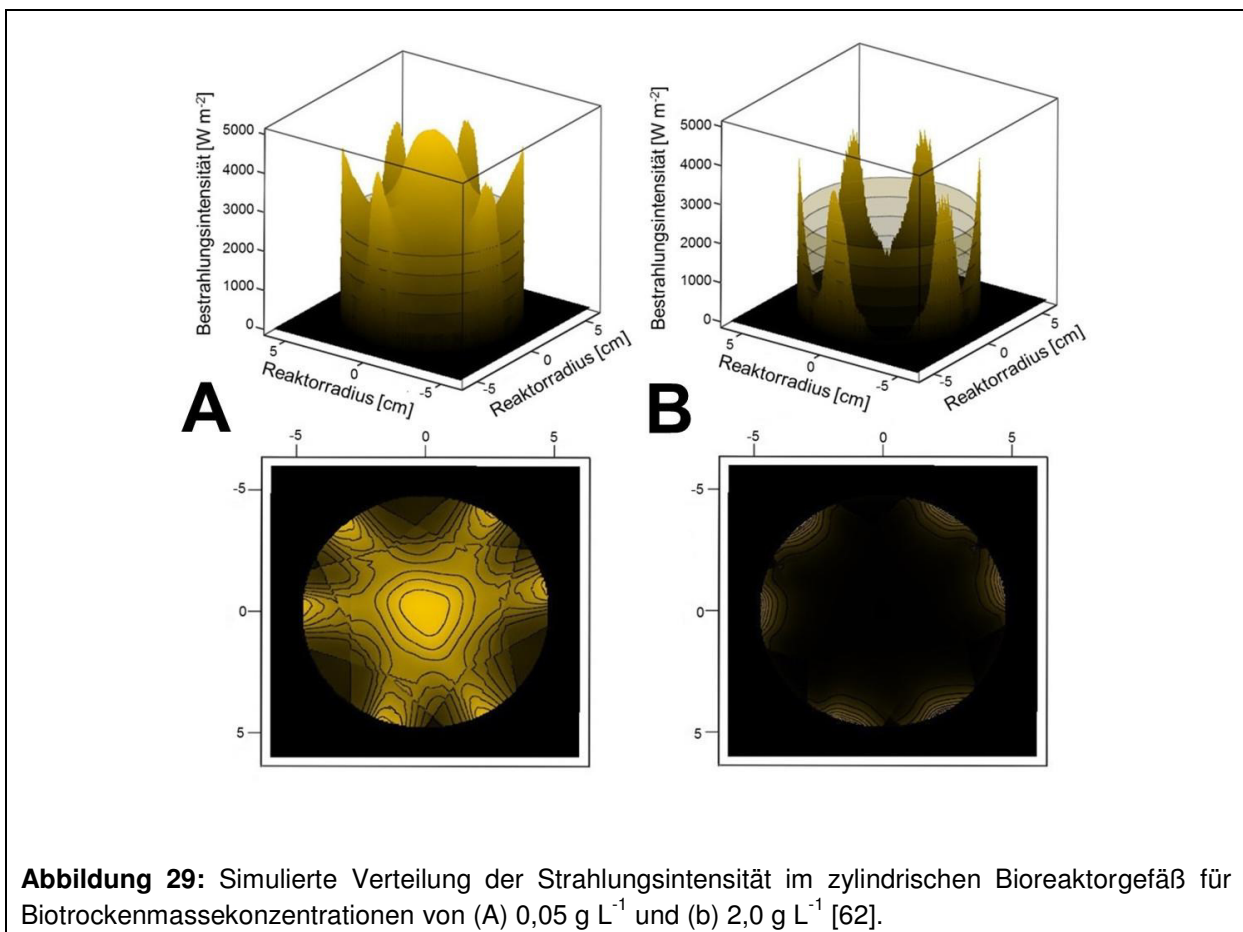
teilungen möglich und können bereits in der Frühphase der Reaktorauslegung berücksichtigt und optimiert werden.

2.3.6 Empirische Simulation der Strahlungsverteilung im Halogen-Photobioreaktor

Um die Intensität der Strahlung über den Durchmesser des Halogen-Photobioreaktors qualitativ und quantitativ zu beschreiben, wurden die empirischen Modellparameter für das hyperbolische Modell von Suh und Lee [61] gemäß Kapitel 2.2.13 bestimmt. Das hyperbolische Modell (Gleichung 7) wurde mittels MATLAB 2012 an die experimentellen Daten gefittet, um die Parameter ε_m , K_c and K_l zu ermitteln:

$$\varepsilon_m = 0,0556 \quad K_c = 1,21 \text{ g L}^{-1} \quad K_l = -51,51 \text{ m}$$

Mit Hilfe dieser Parameter wurde die Strahlungsintensitätsverteilung über den Photobioreaktordurchmesser für verschiedene Prozessbedingungen simuliert. Die variable Prozessgröße ist die Biotrockenmassekonzentration von *R. sphaeroides* DSM158.



In Abbildung 29A ist die simulierte Intensitätsverteilung für die Prozessbedingungen direkt nach der Inokulation des Halogen-Photobioreaktors dargestellt (BTM von $0,05 \text{ g L}^{-1}$). Bedingt

durch die geringe Zellkonzentration und die daraus resultierende geringe Selbstabschattung kumuliert die Intensität der kreisförmig angeordneten Strahlungsquellen im Zentrum des zylindrischen PBR-Gefäßes zu einem Maximum. Über den gesamten Durchmesser des Photoreaktors werden die Zellen mit hohen Strahlungsintensitäten versorgt. Abbildung 29B visualisiert Fließgleichgewichtsbedingungen bei einer BTM von $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Dies entspricht in etwa der Konzentration an aktiver katalytischer Biomasse, die für die Variation der Rührer-Reynolds-Zahl erzielt wurde. Es sind signifikante Unterschiede in der Verteilung der Strahlungsintensität zu erkennen. Die Intensität wird aufgrund der hohen Zelldichte durch Streuung, Absorption und Selbstabschattung innerhalb des ersten Zentimeters nach dem Passieren der transparenten PBR-Wand auf Werte unter 100 W m^{-2} abgeschwächt. Die Versorgung der phototrophen bakteriellen *R. sphaeroides* DSM158 Zellen mit ausreichend Strahlungsenergie ist demnach nur durch eine gerichtete zelluläre Bewegung zur Bioreaktorperipherie möglich.

Da die wichtigsten physikalischen Effekte, d.h. sowohl Streuung, Absorption und Selbstabschattung, durch das hyperbolische Modell berücksichtigt werden, gibt die Simulation ein realistisches Abbild der Prozessbedingungen hinsichtlich der Strahlungsintensitätsverteilung im Halogen-Photobioreaktor. Durch die Nutzung mathematischer komplexerer Ansätze, z.B. Monte-Carlo-Simulationen, wäre eine Präzisierung der simulierten Ergebnisse möglich. Beispielsweise nutzten Csögör et al. [45] den Monte-Carlo-Ansatz um die Flugbahn von Photonen durch bakterielle Dispersionen zu simulieren. Jedoch müssen für diese Art der Simulation eine große Anzahl an Parametern berücksichtigt und experimentell bestimmt werden, u.a. die Absorption, Brechung oder Streuung der Photonen an verschiedenen Oberflächen, z.B. Zellen oder Gasblasen. Im Vergleich dazu sind empirische Ansätze, wie das in dieser Arbeit genutzte hyperbolische Modell, robuster und durch eine geringere Anzahl an Parameter einfacher zu handhaben.

2.3.7 Charakterisierung der Strömungszustände mittels *Computational Fluid Dynamics* (CFD)

In klassischen Photobioreaktoren, wie Blasensäulen, Plattenreaktoren oder Flat-Panel-Airlift Reaktoren, erfolgt der Leistungseintrag zum Zwecke der Durchmischung auf pneumatischem Wege. Diese Reaktortypen sind demnach für die Kultivierung von fakultativ oder obligat anaeroben phototrophen Organismen ungeeignet, da sie mit teurem Edelgas begast werden müssten, um sauerstofffreie Bedingungen und die aktive Durchmischung der Kulturbrühe zu gewährleisten. Aus diesem Grund werden anaerobe phototrophe Organismen vorwiegend in geschlossenen und extern bestrahlten Laborflaschen oder Reagenzgläsern kultiviert [78], wodurch die Möglichkeiten für das Prozessmonitoring und -steuerung deutlich eingeschränkt

sind. Obwohl Rührkesselreaktoren ein geringeres Oberfläche/Volumen-Verhältnis im Vergleich zu Platten- oder Röhrenreaktoren aufweisen, stellen sie eine sinnvolle Alternative für die Photofermentation unter anaeroben Bedingungen dar. Zudem ist es möglich, das Strömungsprofil und damit die Bewegung der Zellen im Volumen des Photobioreaktors durch die Wahl des Rührertyps gezielt zu beeinflussen. Aus diesem Grund ist die Charakterisierung der Strömungseigenschaften bzw. der Fluid-Zell-Interaktion essentiell für die Optimierung der Prozessperformance.

Durch die Symmetrie des zylindrischen Reaktorgefäßes wurde die Geometrie auf ein zweidimensionales Problem reduziert. Dieses Vorgehen wird typischerweise angewendet, um die Anforderungen an die Rechenleistung und -zeit für die Simulation von Strömungszuständen zu minimieren [54]. Ein weiterer wichtiger Parameter, der direkten Einfluss auf die Komplexität der Rechnung hat, ist die Anzahl der gewählten Gitterpunkte des Netzes. Lestinsky et al. [79] fand eine gute Übereinstimmung zwischen simulierten und experimentell validierten Werten mit COMSOL Standardnetzen, die eine Maschenweite von 0,001 m und 0,007 m aufwiesen. In dieser Studie wurde die Maschenweite für die einzelnen Modellbereiche schrittweise angepasst bis ein akzeptables Konvergenzverhalten nach einer Rechenzeit von ca. 5 Tagen erzielt wurde. Die finale Netzstruktur setzte sich aus Maschenweiten zwischen 0,0015 m und 0,0038 m zusammen. In Abbildung 30 sind die Strömungsprofile für den simulierten Rührkessel, der dem Halogen-Photobioreaktor entspricht, in Abhängigkeit der eingestellten Rührerdrehzahl dargestellt. Die drei 6-fach Scheibenrührer induzieren eine radiale Strömung in Richtung der Reaktorperipherie. Die höchste Fluidgeschwindigkeit v [m s^{-1}] wird im Bereich der Rührerblätter erzielt. Bei einer Drehzahl von 150 rpm wurde eine maximale radiale Fluidgeschwindigkeit (v_{maxr}) von $0,3 \text{ m s}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert stimmt mit simulierten und experimentell validierten Werten von Costes und Couderc [80] überein, die in einem vergleichbaren Versuchsaufbau ein v_{maxr} von $0,3 \text{ m s}^{-1}$ bei 165 rpm mittels Laser-Doppler-Anemometrie bestimmten.

Eine Drehzahl von 150 rpm zeigte zudem schlecht durchmischte Bereiche ($v \leq 0,1 \text{ m s}^{-1}$), v.a. am Reaktorboden und oberhalb der installierten Rührer sowie in deren Zwischenbereichen. Durch die Steigerung der Rührerdrehzahl auf 300 rpm, 600 rpm und 750 rpm wurden für v_{maxr} folgende Werte errechnet: $0,6 \text{ m s}^{-1}$, $1,3 \text{ m s}^{-1}$ und $1,6 \text{ m s}^{-1}$. Neben der radialen Strömung wurden bei steigender Rührerdrehzahl zusätzlich verstärkte tangentielle Strömungen induziert, die eine Quervermischung der einzelnen Reaktorzonen ermöglichten.

Die höchste kontinuierliche ($D = 0,096 \text{ h}^{-1}$) volumetrische Wasserstoffproduktivität (r_{H_2}) wurde bei einer Re_R von 12600 ermittelt. Unter Berücksichtigung der vorherrschenden Strömungsbedingungen entspricht dies einem schwach turbulenten Strömungsmilieu.

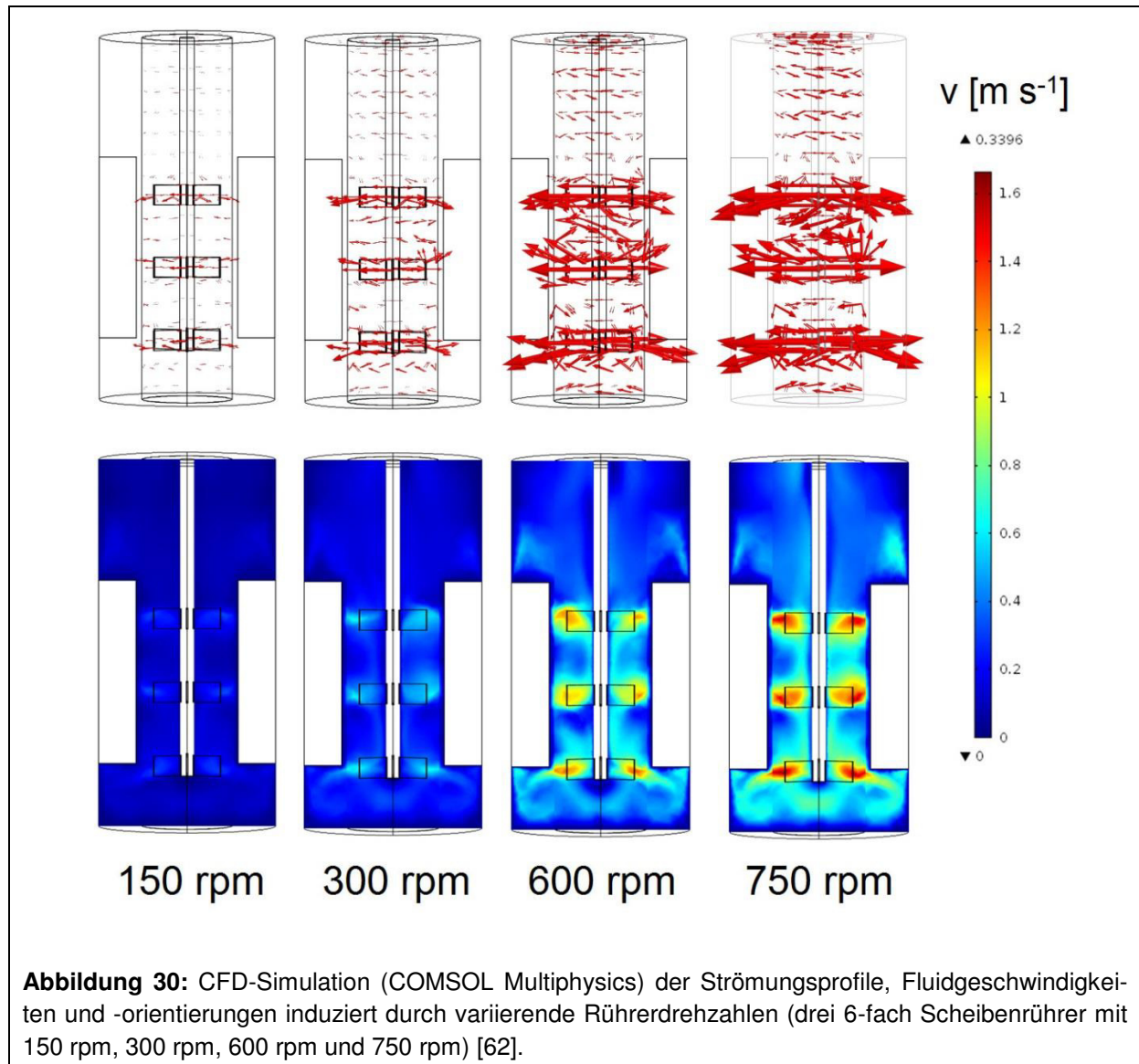


Abbildung 30: CFD-Simulation (COMSOL Multiphysics) der Strömungsprofile, Fluidgeschwindigkeiten und -orientierungen induziert durch variierende Rührerdrehzahlen (drei 6-fach Scheibenrührer mit 150 rpm, 300 rpm, 600 rpm und 750 rpm) [62].

Durch die tangentielle Quervermischung des Mediums bei steigendem Turbulenzgrad erfährt die Strömung eine geringere Orientierung zur Bioreaktorperipherie. Die Bewegung der Zellen, die durch das Strömungsprofil bestimmt wird, erfolgte somit weniger gerichtet zur Bioreaktorwandung, die eine hohe Strahlungsintensität für *R. sphaeroides* DSM158 zur Verfügung stellt. Die verringerte Versorgung der Zellen mit PAR-Strahlung führte demnach zur Abnahme von r_{H_2} .

2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die photofermentative Wasserstoffproduktion mittels PNS-Bakterien wird in zahlreichen Veröffentlichungen thematisiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Prozessparameter der mittleren Bestrahlungsstärke (I_0) und des volumetrischen Leistungseintrages (P_0/V_L) in einem gerührten Halogen-Photobioreaktor bzw. die Etablierung eines kontinuierlichen Bioprozesses zur Wasserstoffproduktion. Die selbst konzipierte Bestrahlungseinheit erlaubte die stufenlose Variation der Bestrahlungsintensität bis zu 2500 W m^{-2} , eine bis dato nicht beschriebene Intensitätshöhe. Der volumetrische Leistungseintrag P_0/V_L zeigte einen geringeren Einfluss auf die erzielte Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} im Satzbetrieb im Vergleich zur mittleren Bestrahlungsstärke I_0 . Innerhalb des Variationsbereiches dieser beiden Prozessparameter ergab sich im Satzbetrieb eine optimale r_{H_2} von $195 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $P_0/V_L = 0,55 \text{ kW m}^{-3}$ und $I_0 = 2250 \text{ W m}^{-2}$. Diese Bedingungen wurden durch das Zuschalten eines Medienzu- und ablaufs in eine kontinuierliche Prozessführung überführt und hinsichtlich der Durchflussrate D und der Rührer-Reynolds-Zahl Re_R optimiert. Mit $170,5 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde die höchste bisher kontinuierlich produzierte Wasserstoffproduktionsrate für *R. sphaeroides* DSM158 bei einer Durchflussrate von $0,096 \text{ h}^{-1}$ und einem schwach turbulenten Strömungsmilieu ($Re_R = 12600$) erzielt. Aufgrund der steigenden biomassebezogenen r_{H_2} bei zunehmender Durchflussrate D ist eine weitere Steigerung der Wasserstoffproduktivität möglich. Dazu ist es notwendig, die Strahlungsintensitätsverteilung, als limitierenden Faktor des Bioprozesses, auch für hohe Konzentrationen katalytisch aktiver Biomasse gleichmäßig in hohen Intensitäten bereitzustellen. Ein Übergang zu alternativen Photobioreaktorsystemen ist dabei unumgänglich. Es konnte gezeigt werden, dass unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren, die im Zusammenhang mit der Energiequelle Licht stehen, ein vertieftes Prozessverständnis erlangt werden kann. Als wichtigste Einflussfaktoren wurden in dieser Arbeit die Verteilung der Strahlungsintensität auf der Reaktoroberfläche ausgehend von den Strahlungsquellen, die Verteilung der Strahlungsintensität über den Durchmesser des Bioreaktors in Abhängigkeit der Biomassekonzentration und die Strömungsbedingungen, die einen direkten Einfluss der zellulären Bewegung im Reaktorsystem haben, berücksichtigt. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Auslegung und Entwicklung neuer Bioreaktorkonzepte.

3. *Green Bioprinting* - Mikroalgenkultivierung und Biomonitoring in 3D-geplotteten Hydrogelen

3.1 Einleitung

Mikroalgen als Produktionssysteme in biotechnologischen Prozessen sind vor allem durch ihre Fähigkeit, CO₂ als Kohlenstoff- und Licht als einzige Energiequelle zu nutzen, von wachsendem industriellem Interesse. Der Bedarf an Produkten der biogenen Wertschöpfung umfasst dabei vor allem erneuerbare Energieträger, die nachhaltige Produktion von Plattformchemikalien und die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe [17, 81, 82]. Darüber hinaus finden Mikroalgen, bedingt durch gute Sorptionseigenschaften von Metallen und organischen Verbindungen ebenfalls Anwendung als Indikator für belastete Gewässer (Biosensoren) bzw. für deren Sanierung (Phytoremediation) [83].

Chlamydomonas reinhardtii und *Chlorella sorokiniana* sind aufgrund ihrer hohen Wachstumsraten, robusten Kultivierungseigenschaften und molekularbiologischen Manipulierbarkeit weit verbreitete Modellorganismen, sowohl in der Photosyntheseforschung als auch für biotechnologische Anwendungen [84]. Die Kultivierung von Mikroalgen erfolgt typischerweise in Form von Suspensionskulturen, wobei die Immobilisierung von Mikroalgen Vorteile in Bezug auf die Aufarbeitung der Biomasse und die Scherbeanspruchung während der Kultivierung hat. Das Ziel dieser Studie ist es, die Kultivierung von *C. reinhardtii* und *C. sorokiniana* in 3D-gedruckten Hydrogelen im Vergleich zu äquivalenten Suspensionskulturen zu untersuchen. Dabei liegt der Fokus in der Abhängigkeit der Populationsviabilität und der Wachstumsrate von der Prozesstemperatur und den Beleuchtungsbedingungen.

3.1.1 Hydrogele - Aufbau, Eigenschaften und Verwendung

Die natürlichen Vorbilder für synthetische Hydrogele, wie sie heute in der Forschung eingesetzt werden, finden sich u.a. in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von menschlichem Gewebe und Organen aber auch in der Zusammensetzung der Polymermatrix von Biofilmen wieder.

Der Begriff Hydrogel umschreibt ein dreidimensionales hydrophiles Netzwerk, das aus natürlichen oder synthetischen Polymeren mit einem hohen Wasseranteil aufgebaut ist [85]. Ullah et al. (2015) nehmen eine übergeordnete Klassifizierung anhand der zugrundeliegenden intermolekularen Wechselwirkungen der polymeren Bestandteile vor [85]. Die Autoren unterscheiden dabei physiologische und chemische Hydrogele. Eine kovalente und damit irreversible Vernetzung chemischer Hydrogele erfolgt durch die Zugabe einer Vernetzungschemikalie, wohingegen in physiologischen Hydrogelen nichtkovalente Wechselwirkungen, z.B.

Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen die Hydrogelstruktur bestimmen.

Die spezifischen Eigenschaften von Hydrogelen sind abhängig von ihrer Verwendung, die sowohl die Gebiete der Biomedizin [86], der Biotechnologie [87], der Lebensmittelindustrie [88], der Pharmazie [89], der Kosmetik [90] als auch die Agrarwissenschaften [91] umfasst. Um lebende Zellen in Hydrogelen zu immobilisieren, sind folgende Eigenschaften von großer Bedeutung: der Herstellungsprozess bzw. die Formgebung, die Biokompatibilität und die Sterilisierbarkeit des Gelmaterials.

Im *Tissue Engineering* hat sich die Verwendung von alginatbasierten Hydrogelen zur Nachbildung der extrazellulären Matrix von menschlichen Geweben und Organen etabliert. Alginat besteht aus den Uronsäuren α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure, die über eine 1,4-glykosidische Bindung verkettet sind. Alginat-Hydrogele eignen sich aufgrund der milden Schwell- und Vernetzungsbedingungen, der hohen Biokompatibilität zu humanen Zellen und Wachstumsfaktoren bzw. der modifizierbaren Eigenschaften ideal als 3D-Mikroumgebung [92] für die Zellkultivierung. Durch ihre transparenten Eigenschaften ermöglichen alginatbasierte Hydrogele konventionelle mikroskopische Methoden zum Monitoring der zellulären Eigenschaften.

Zur Herstellung dreidimensional strukturierter Hydrogele, so genannter *Scaffolds*, haben sich im *Tissue Engineering* Methoden des *Rapid Prototyping* etabliert. Die als 3D-Bioprinting bezeichneten Verfahren beruhen auf der Arbeit von Landers und Mühlhaupt [93], die erstmals das computergestützte Plotten von polymeren Strukturen beschrieben. Dabei wird ein hochviskoses Polymer in einem Extrusionsprozess über eine Dosiernadel in einer vorgegebenen Struktur verteilt. Die besonderen Herausforderungen im *Tissue Engineering* sind die mechanische Stabilität und die Herstellung von *Scaffold*-Strukturen in klinisch relevanten Größen, wobei die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen während der Anzucht der Zellen und eine schnelle Vaskularisierung des künstlichen Gewebes gewährleistet sein müssen.

Wegweisende Arbeiten auf dem Gebiet der Materialherstellung für das 3D-Bioprinting wurden durch Schütz et al. (2015) beschrieben [94]. Die Autoren erzielten durch die Zugabe von Methylcellulose zu einer 3%igen Alginatlösung ein Hydrogelmaterial, das durch seine erhöhte Viskosität sehr gute mechanische Eigenschaften während der Extrusion zeigte, wodurch die Herstellung von mechanisch stabilen 50-schichtigen Hydrogelstrukturen realisiert werden konnte. Die Methylcellulose, die sich im Kultivierungsverlauf aus der Hydrogelmatrix herauslöst [94], zeigte dabei keine toxischen Effekte auf die eingebetteten mesenchymalen Stammzellen und erzeugte eine hochporöse Struktur auf der Mikroebene, die eine effektive Nähr-

stoffversorgung ermöglichte [94]. Diese Arbeit bildet die Grundlage für die in dieser Studie präsentierte Mikroalgenimmobilisierung und -kultivierung in 3D-geplotteten Hydrogelen.

3.1.2 Kultivierungsumgebungen und Biomonitoring von Mikroalgen- Populationen

Die Anzucht von Mikroalgen erfolgt in offenen oder geschlossenen Photobioreaktoren, die je nach Applikation in unterschiedlichen Maßstäben und Bioreaktortypen ausgelegt sind. Die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR), die den phototrophen Mikroorganismen als Energiequelle zugeführt werden muss, wird für die Mehrzahl der Laborkultivierungssysteme durch eine artifizielle Lichtquelle von außen durch das transparente Reaktorgefäß bereitgestellt [22]. Bedingt durch die Selbstabschattung der Mikroorganismen, physikalische Effekte beim Eintritt der Strahlung in den Bioreaktor und Absorption von Photonen durch die Lichtsammelkomplexe der Mikroorganismen, bildet sich ein dynamisch veränderndes Lichtprofil in den Reaktorgefäßen aus. Diese Heterogenität der Prozessbedingungen führt zwangsläufig zur Ausbildung von heterogenen Populationsstrukturen innerhalb einer phototrophen Zellpopulation. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Heterogenität von Zellpopulationen einen signifikanten Einfluss auf die Produktivität von biotechnologischen Prozessen hat [95,96].

Für mikrobielle Prozesse ist die Viabilität der Kultur ein essentieller Parameter, weil die Produktivität direkt durch die Anzahl der katalytisch aktiven Einheiten in der Kultur bestimmt wird. Aus diesem Grund ist es wichtig, Methoden zur Quantifizierung der Populationsviabilität auf Einzelzellebene zu etablieren und als Tool für das Prozessmonitoring von photobiotechnologischen Prozessen anzuwenden.

Konventionelle Methoden zur Ermittlung des physiologischen Zustandes von Mikroalgen werden im Übersichtsartikel von Gallo-Villanueva et al. (2011) zusammengefasst [97]. Dazu werden Parameter wie die Kohlenstoffdioxidaufnahme, die ATP-Bildung, die Sauerstoffproduktion und koloniebildende Einheiten ermittelt [98]. Diese Methoden liefern jedoch nur Informationen über die durchschnittliche Zellpopulation und vernachlässigen die Bildung von Subpopulationen bzw. deren Anteil an den genannten Parametern und damit die Heterogenität innerhalb der Kultur.

Die Analyse von Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie hat sich auch im Bereich der Mikroalgen etabliert [99]. Hydrodynamisch fokussierte Einzelzellen werden dabei durch einen Laser angeregt und die erzielten Lichtstreuungs- und Fluoreszenzsignale genutzt, um Informationen über den Zellquerschnitt, die Granularität der Zellen bzw. über spezifisch markierte Zelleigenschaften (z.B. Zellzyklusphase anhand einer DNA-Fluoreszenzfärbung) zu erhalten.

Aktuelle Anwendungsschwerpunkte sind die zellulären Antworten von Mikroalgenpopulationen auf Stressbedingungen, u.a. durch Schwermetalle [100], Herbizide [101], Kontaminationen [102], oxidativen Stress [103] oder hohe Scherbelastung [104]. Die Anwendung dieser Analyseverfahren für das Prozessmonitoring des physiologischen Zustandes von Mikroalgen bzw. die Identifizierung von Subpopulationen spielte bisher allerdings eine untergeordnete Rolle.

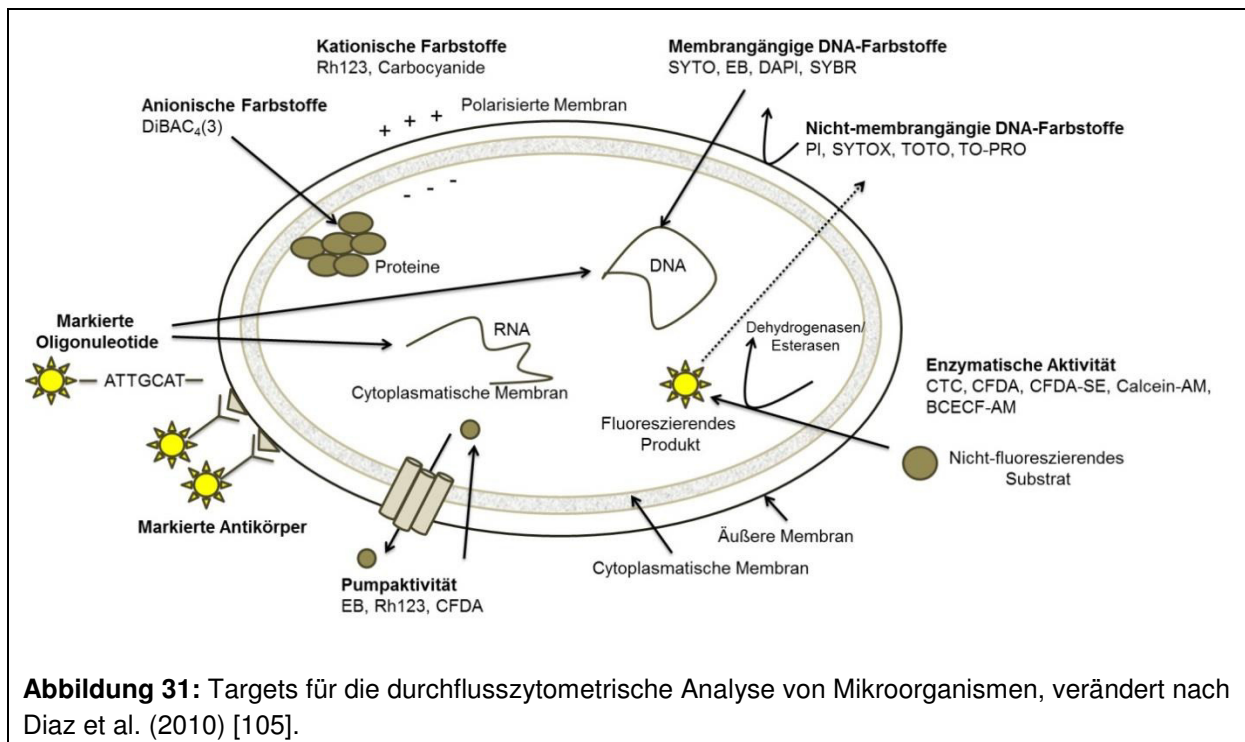


Abbildung 31: Targets für die durchflusszytometrische Analyse von Mikroorganismen, verändert nach Diaz et al. (2010) [105].

Der hohe zelluläre Anteil an photosynthetisch aktiven Pigmenten in Mikroalgen und Cyanobakterien, u.a. Chlorophylle, Carotinoide oder fluoreszierende Proteine wie Phycoerythrin und Phycocyanin, schränken die Auswahl an nutzbaren Fluoreszenzfarbstoffen ein, da die Eigenfluoreszenz der zu analysierenden Zellen berücksichtigt und gegebenenfalls eine Kompensation der Fluoreszenzsignale durchgeführt werden muss. Abbildung 31 gibt einen Überblick über potentielle zelluläre Targets, die für die Ermittlung der Zellviabilität von Mikroorganismen genutzt werden können.

Es sollte ein sensitiver Fluoreszenzfarbstoff gewählt werden, der eine Anregung durch eine UV-Lichtquelle oder einen blauen Feststofflaser (488 nm) aufweist und in der spektralen „Grünlücke“ der Zellen sein Fluoreszenzmaximum hat, um eine Überlappung mit den Autofluoreszenzsignalen der Zellen zu verhindern [99]. In den Arbeiten von Dorsey et al. [106], Prado et al. [101] und Michels et al. [104] wurde Fluoresceindiacetat (FDA) genutzt, um die Viabilität von Mikroalgenpopulationen über die enzymatische Aktivität zu detektieren. FDA diffundiert in die Zellen, wodurch der ungeladene Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und in ein polar fluoreszierendes Produkt umgewandelt wird [99]. Nachteile die-

ser Methode sind die starke Abhängigkeit der Esteraseaktivität vom intrazellulären pH-Wert und die Diffusionsbedingungen in die Zellen.

3.1.3 Immobilisierung von Mikroalgen und deren Anwendung

Für die Mehrzahl der photobiotechnologischen Anwendungen werden Mikroalgen in Form von Suspensionskulturen kultiviert. Die Immobilisierung von photosynthetisch aktiven Zellen bietet jedoch Vorteile bei der Abtrennung oder dem Wechsel des Kulturmediums (2-stufige Verfahren) bzw. bei der Nutzung schersensitiver Organismen [107]. In seinem Übersichtsartikel unterscheidet Moreno-Garrido (2008) zwischen aktiven und passiven Immobilisierungsmethoden für Mikroalgen [108]. Passive Immobilisierung umfasst dabei die Adhäsion von Zellen an Oberflächen, u.a. in Form von Biofilmen oder die Behandlung mit flockenbildenden Agentien, z.B. Chitosan. In dieser Studie liegt der Fokus auf der aktiven Immobilisierung, d.h. der Einschluss lebender Zellen in eine dreidimensionale Matrixstruktur. Natürliche Polysaccharide wie Carrageenan, Alginat oder Agar-Agar sind die am häufigsten genutzten Verbindungen zur Immobilisierung metabolisch aktiver Mikroalgen [109], wobei Alginat aufgrund der hohen Biokompatibilität und der einfachen Handhabbarkeit das bevorzugte Material zur Zellimmobilisierung darstellt.

Sing et al. (2003) fanden einen höheren Chlorophyll- und Carotinoidgehalt in Alginat-immobilisierten Mikroalgen, woraus sich eine höhere photosynthetische Aktivität und Lipidproduktion im Vergleich zu Suspensionskulturen ergab [110]. In der Literatur sind zahlreiche weitere Vorteile für immobilisierte Mikroalgenkulturen beschrieben, u.a. eine verbesserte Glycerolproduktivität von *Dunaliella tertiolecta* [111], eine höhere Biotransformationskapazität (Codein zu Morphin) von *Spirulina platensis* [112] und eine höhere Resistenz Chitosan-immobilisierter *Synechococcus* ssp. Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von Natriumhydroxid [113].

Die Nutzung photosynthetisch aktiver Mikroalgen als natürlicher Sauerstofflieferant ist ebenso ein aktueller Forschungsgegenstand im Bereich des *Tissue Engineerings* [114]. Wegweisende aktuelle Arbeiten auf diesem Gebiet werden am Universitätsklinikum der Technischen Universität München durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Hopfner et al. (2014) beschrieben die homogene Verteilung und hohe photosynthetische Aktivität von *C. reinhardtii* Zellen in einem collagenbasierten *Scaffold* [115]. Darüber hinaus realisierten die Autoren eine co-Kultivierung von *C. reinhardtii* und Fibroblasten und belegten die Verringerung der hypoxischen Stressantwort der Bindegewebszellen durch den Einfluss der Mikroalgen. In der weiterführenden Arbeit von Schenck et al. (2015) wurden die mikroalgenbeladenen Collagen-*Scaffolds* am Mausmodell getestet und keine Immunantwort des Wirtsorganismus festgestellt [116]. Über den Versuchszeitraum von fünf Tagen konnte zudem ein hoher Vaskularisie-

rungsgrad des Scaffoldmaterials festgestellt werden. Im Folgenden beschrieben Chavez et al. (2016) die Herstellung von genetisch angepassten Mikroalgen-Scaffolds [117]. Dabei wurden Mikroalgen zusätzlich zur Sauerstoffversorgung für die Synthese und Ausschleusung des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) genutzt und das „*Proof of Concept*“ für eine photosynthetische Gentherapie in der Regenerativen Medizin erbracht.

3.2 Material und Methoden

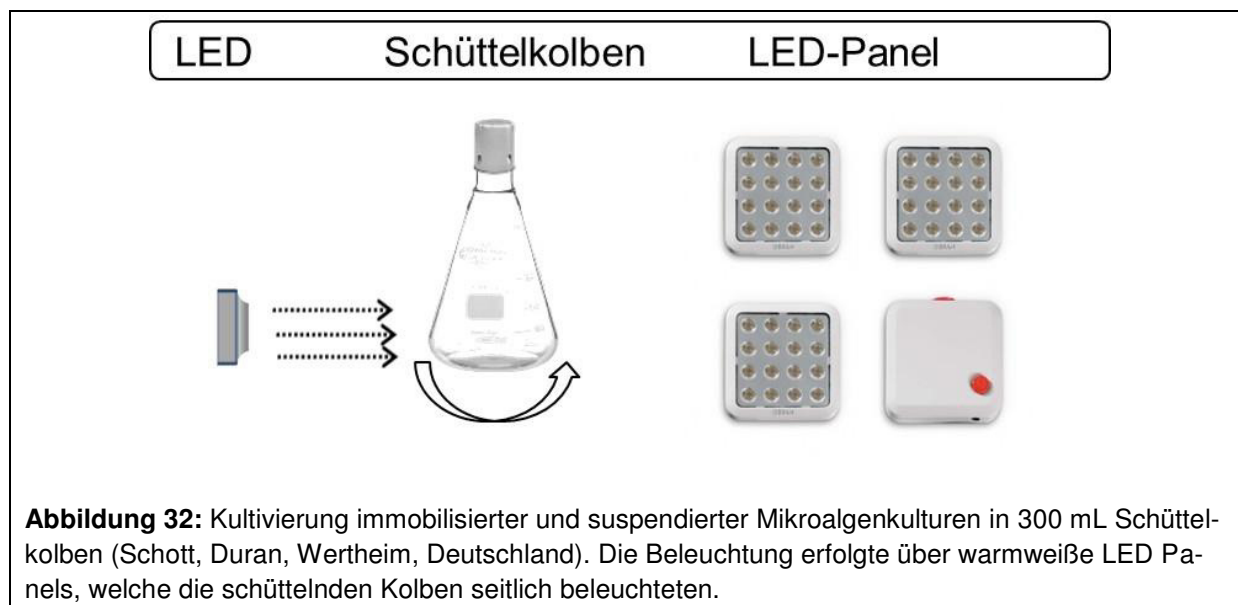
3.2.1 Mikroalgen - Stämme und Kultivierung

Chlamydomonas reinhardtii 11.32b wurde in Form einer Schrägagarkultur von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen bezogen. Neben dem Modellorganismus *C. reinhardtii* 11.32b wurden Untersuchungen mit der hitzetoleranten Mikroalge *Chlorella sorokiniana* UTEX1230 durchgeführt. Der Wildtypstamm wurde als Lyophilisat von der Algensammlung der *University of Texas* (UTEX, Austin, USA) erworben.

Die Anzucht der Algenstämme erfolgte durch die Inokulation von 20 mL flüssigem Tris-Phosphat (TP) - Medium in 300 mL Schüttelkolben (Schott Duran, ohne Schikanen, Wertheim, Deutschland) ausgehend von Tris-Acetat-Phosphat-(TAP)-Agarplatten. Die Zusammensetzung des TAP bzw. TP-Mediums wurde der frei zugänglichen Wissensplattform <http://www.chlamycollection.org> entnommen. Um photoautotrophes Wachstum zu gewährleisten, wurde auf Acetat als potentielle Kohlenstoffquelle verzichtet (TP-Medium). Die Schüttelkolbenkulturen wurden für 48 h in einem Brutschrank (infors minitron, infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei 26 °C, 100 rpm und 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ LED-Dauerbeleuchtung inkubiert. Die LED-Panels (warmweiße LEDs, Osram, München, Deutschland) wurden an der Wand des Brutschrankes fixiert. Daraus folgte eine einseitige Beleuchtung der geschüttelten Kolben (Abbildung 32).

3.2.2 Suspensionskulturen - Einfluss der Temperatur und Beleuchtungszyklen

Die beschriebenen Vorkulturen von *C. reinhardtii* 11.32b oder *C. sorokiniana* UTEX1230 wurden als Inokulum für die zu untersuchenden Suspensionskulturen bei 26 °C, 30 °C und 37 °C verwendet. Dazu wurde die Vorkultur in 20 mL TP-Medium auf eine initiale optische Dichte ($\text{OD}_{750\text{nm}}$) von 0,1 verdünnt und in 300 mL Schüttelkolben (Schott Duran, ohne Schikanen, Wertheim, Deutschland) transferiert. Die Kultivierung erfolgte für 144 h und der zu untersuchenden Temperatur (26 °C, 30 °C und 37 °C) bei 100 rpm und 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ warmweißer LED-Beleuchtung.



Die Lichtintensitätsmessung der LED-Panels erfolgte mittels eines Pyranometers (deka Sensor+Technologie, Teltow, Deutschland), das sensitiv für Wellenlängen im Bereich von 400 - 700 nm (PAR-Strahlung) ist war. Die Beleuchtungszyklen wurden entweder auf 24/0 h (kontinuierliche Beleuchtung) oder 14/10 h (Hell-/Dunkelzyklen) eingestellt. Alle Kultivierungsbedingungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Im Verlauf der Kultivierung erfolgten manuelle Probenahmen, um die Zellkonzentration durch die Lichttrübung bei 750 nm (helios β Spektralphotometer, Thermo Scientific, Deutschland) und die Populationsviabilität mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen.

Die Wachstumsrate μ [d^{-1}] wurde wie folgt ermittelt:

$$\mu = \frac{\ln(BTM_t) - \ln(BTM_0)}{t - t_0} \quad (12)$$

wobei BTM_0 und BTM_t die Biotrockenmassen zu Beginn der Kultivierung (t_0) und am 6. Kultivierungstag ($t = 144$ h) beschreiben.

3.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Viabilität von suspendierten Mikroalgenkulturen

Nach der Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Proben der Suspensionskultur in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) auf eine Zelldichte von 1×10^4 - 1×10^5 Zellen mL^{-1} (OD_{750nm} ca. 0,01) verdünnt. Die Viabilitätsfärbung wurde mit dem Bis-Oxonol-Farbstoff DiBAC₄(3) (bis-(1,3-dibarbituric acid)-trimethine oxonol, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) bei Raumtemperatur und einer Arbeitskonzentration von $2,5 \mu g m L^{-1}$ (stock-Lösung $5 mg mL^{-1}$ in Dimethylsulfoxid) durchgeführt.

Der anionische Farbstoff DiBAC₄(3) ist ein Indikator für das zelleigene Membranpotential. Falls die Zellmembran depolarisiert vorliegt, kann der Farbstoff in die Zelle diffundieren und an intrazelluläre Proteine binden. Diese Bindung resultiert in einem verstärkten Fluoreszenzsignal. Das Anregungsmaximum von DiBAC₄(3) liegt bei 490 nm, das Maximum des rotverschobenen Fluoreszenzsignals bei 516 nm, wodurch ein konventionelles Anregungs-/Filtersetups für Fluorescein oder das *Green Fluorescent Protein* genutzt werden kann.

Die gefärbten Proben wurden mittels eines Cube8 Durchflusszytometers (Partec GmbH, Münster, Deutschland) analysiert. Die Anregung der hydrodynamisch fokussierten Zellen erfolgte mit einem 20 mW 488 nm Festkörperlaser. Das Fluoreszenzsignal wurde über einen 590/50 Bandpassfilter (= 590 ± 50 nm) detektiert. Die rote Fluoreszenz des intrazellulären Photosynthesepigments Chlorophyll wurde als Trigger-Parameter genutzt (675/50 Bandpassfilter). In einem *Forward-Scatter* (FSC)/Chlorophyllfluoreszenz-Dotplot wurde ein *Gate* um die Algenzellpopulation definiert und auf das DiBAC₄(3)-Fluoreszenz-Histogramm angewendet, um die schwachen DiBAC₄(3)-Fluoreszenzsignale vom Rauschen abzugrenzen. Im CyView Setup wurde das „*events in region*“ Protokoll verwendet und die Termination des Messvorganges nach der Detektion von 10⁴ Zellen definiert.

Um Aussagen über die Sensitivität des Messprotokolls zu erlangen, wurden Zellpopulationen von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 in 0,9 %iger Kochsalzlösung auf eine Zelldichte von 1x10⁴ - 1x10⁵ Zellen mL⁻¹ (OD_{750nm} ca. 0,01) verdünnt und für 180 Minuten bei 50 °C und 150 rpm in einem Laborschüttler inkubiert. Um den Prozess der Depolarisierung der Zellmembran zu verfolgen, wurde in 15-Minuten-Intervallen Proben entnommen und nach dem beschriebenen Protokoll analysiert.

3.2.4 Immobilisierung von Mikroalgen in 3D-geplotteten Hydrogelen

Für die Herstellung des Hydrogelmaterials wurden 30 mg mL⁻¹ Natriumalginat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in sterilem Wasser gelöst und anschließend 90 mg mL⁻¹ Methylcellulose beigefügt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Molekulargewicht ca. 88 kDa). Nach intensivem Homogenisieren wurde die Mischung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Quellen der Methylcellulose zu ermöglichen. Der 3D-Plottprozess wurde mit einem BioScaffolder 2.1 unter einer Laminarbox (GeSiM, Großberkmannsdorf, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 33). Unmittelbar vor dem Plotten wurde eine Suspensionskultur von *C. reinhardtii* 11.32b oder *C. sorokiniana* UTEX1230 in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in dem zuvor beschriebenen Hydrogelmateriale in einem Verhältnis von 2x10⁶ Zellen pro Gramm Plottpaste resuspendiert. Dies entsprach einer Zelldichte von ca. 2x10⁵ Zellen pro Hydrogelmatrixkonstrukt. Die Algen-Hydrogelmateriale-Mixtur wurde anschließend in eine Kartusche überführt und in die Dosie-

reinheit des BioScaffolder 2.1 integriert. Mittels Druckluft (1,4 bar) wurde das zellbeladene Hydrogelmaterial mit einer Geschwindigkeit von 10 mm s^{-1} durch eine Nadel (Innendurchmesser: $250 \mu\text{m}$) in eine 6-Well-Mikrotiterplatte gemäß der vorgegebenen 3D-Struktur dosiert. In dieser Studie wurde eine quadratische 4-Schichtstruktur ($0^\circ/90^\circ$ -Orientierung) mit einer x-y-Längenausdehnung von 15 mm und einem Strangabstand von 1,87 mm aufgebaut (siehe Abbildung 33B). Das geplottete Hydrogelkonstrukt wurde anschließend in einer 100 mM CaCl_2 -Lösung für 10 Minuten vernetzt. Für die photoautotrophe Kultivierung wurde das zellbeladene Hydrogel schließlich in TP-Medium überführt.

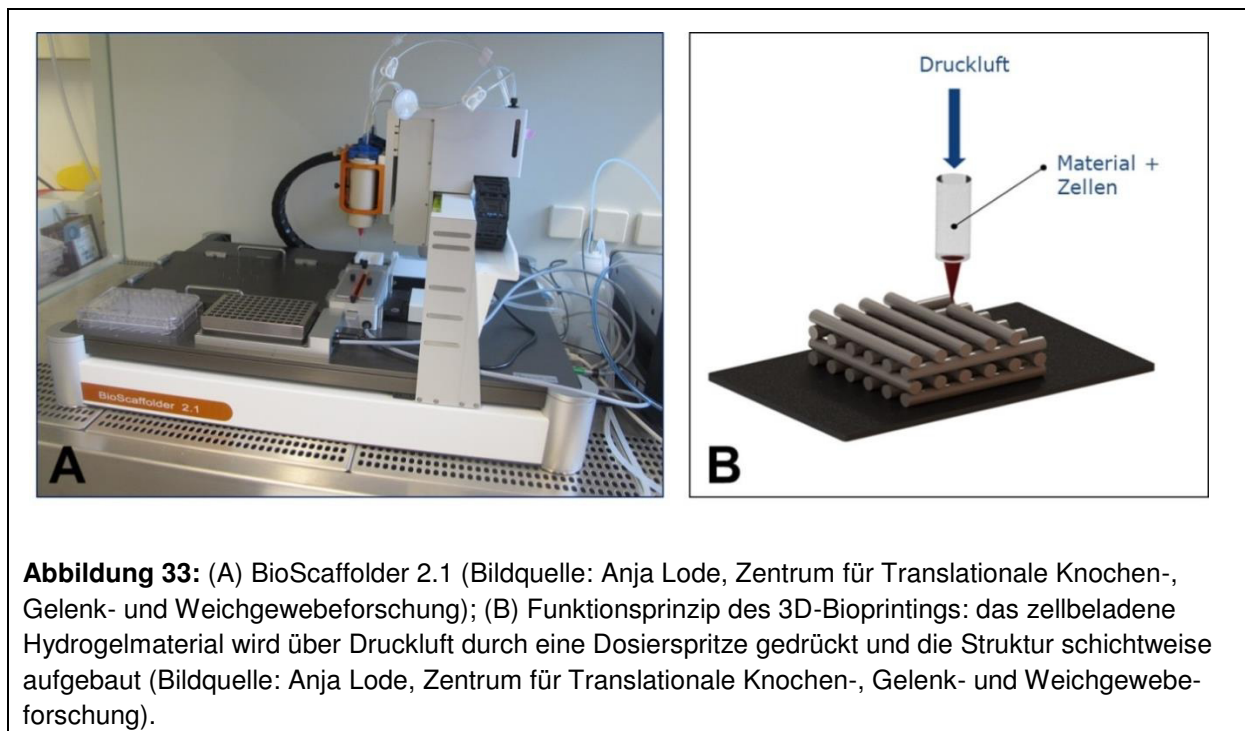


Abbildung 33: (A) BioScaffolder 2.1 (Bildquelle: Anja Lode, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung); (B) Funktionsprinzip des 3D-Bioprintings: das zellbeladene Hydrogelmaterial wird über Druckluft durch eine Dosierspritze gedrückt und die Struktur schichtweise aufgebaut (Bildquelle: Anja Lode, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung).

Um das Wachstum und die Viabilität der Mikroalgenkultur zu evaluieren, wurden sowohl fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der zellbeladenen Hydrogele als auch die Extraktion der Zellen aus der Hydrogelmatrix vorgenommen.

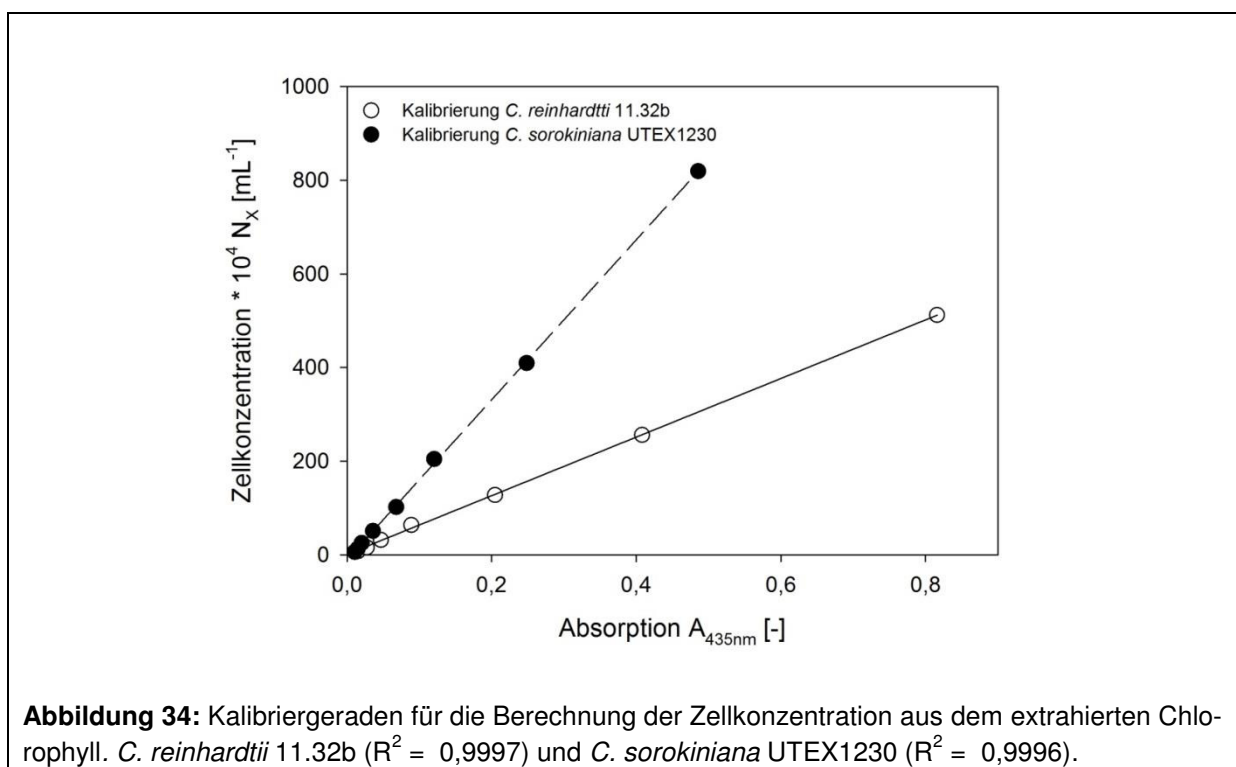
3.2.5 Zellzahlbestimmung von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgenkulturen

Um die Algenzellen aus der Hydrogelmatrix zu gewinnen, wurde das zellbeladene Hydrogel in einer 55 mM Natriumcitrat enthaltenden 0,9 %igen Kochsalzlösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Algenzellen für 15 Minuten bei $13.400 \times g$ sedimentiert und der Chlorophyllgehalt der Pellets nach Hopfner et al. (2014) bestimmt [115]. Dazu wurde das Pellet mit Dimethylsulfoxid versetzt, durch sequentielles Schockfrieren in flüssigem Stickstoff lysiert und schließlich mit Hilfe eines Precellys@24 Systems (Peqlab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Die Absorptionmessung des Lysates erfolgte bei 435 nm über

einen Mikrotiterplatten-Reader (Infinite®M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz). Aus der Absorption wurde die Anzahl der eingebetteten Zellen berechnet. Dazu wurden Kalibriergeraden für die Mikroalgen *C. reinhardtii* 11.32b (Gleichung 13) und *C. sorokiniana* UTEX1230 (Gleichung 14) aufgenommen. Folgende lineare Zusammenhänge zwischen der Absorption A bei 435 nm [-] und der Zellkonzentration N_x [mL^{-1}] konnten festgestellt werden:

$$N_{X_{Chlamy}} [\text{mL}^{-1}] = 636,2 \times A_{435\text{nm}} + 1,6 \quad (13)$$

$$N_{X_{Chlorella}} [\text{mL}^{-1}] = 1674,6 \times A_{435\text{nm}} - 8,6 \quad (14)$$



3.2.6 Ermittlung der Viabilität von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgenkulturen

Die mikroalgenbeladenen Hydrogele wurden unter den gleichen Bedingungen wie die zuvor beschriebenen Suspensionskulturen kultiviert. Für die Bestimmung der Viabilität der eingebetteten Algenzellen wurde ein SYTOX Green basiertes Färbeprotokoll, das für die Viabilitätsbestimmung eingebetteter humaner Zellen genutzt wird, adaptiert. Dieser Schritt war erforderlich, weil für angestrebte Co-Kultivierungen von Algen und humanen Zellen möglichst ein Protokoll genutzt werden sollte. Der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ist ein nicht membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, d.h. er kann nicht in Zellen mit intakter Zellmembran diffundieren. SYTOX Green gefärbte Zellen weisen somit auf eine defekte Zellmembran hin und fluoreszieren grün. Die zellbeladenen Hydrogele

wurden nach 48 h und 144 h Kultivierung in 5 μM SYTOX Green enthaltenes TP-Medium überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls genutzt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie (Zeiss cLS Mikroskop 510). Als Anregungsquelle für den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green wurde ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 510 nm verwendet. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzsignales erfolgte über einen Bandpassfilter (525/10 nm) im grünen Spektralbereich. Die Anregung des intrazellulären Chlorophylls erfolgte über einen Dioden gepumpten Feststofflaser bei 561 nm, wobei das Fluoreszenzsignal bei 605/15 nm detektiert wurde. Der prozentuale Anteil toter Zellen (SYTOX Green gefärbte Zellen) an der Gesamtanzahl von Zellen wurde über die Partikelanalyse des freizugänglichen Bildanalyse-Tools Fiji (Madison, USA) bestimmt. Dafür wurden die erhaltenen Fluoreszenzbilder in den roten und grünen Bildkanal aufgetrennt (Abbildung 35) und über den Li-Algorithmus in binäre Bildformate umgewandelt. Um einzelne Algenzellen über das Partikelanalyse-Tool zu identifizieren, wurden folgende Bedingungen definiert; eine Zirkularität von 0,25 - 1,00 und eine Fläche von $90 \mu\text{m}^2$.

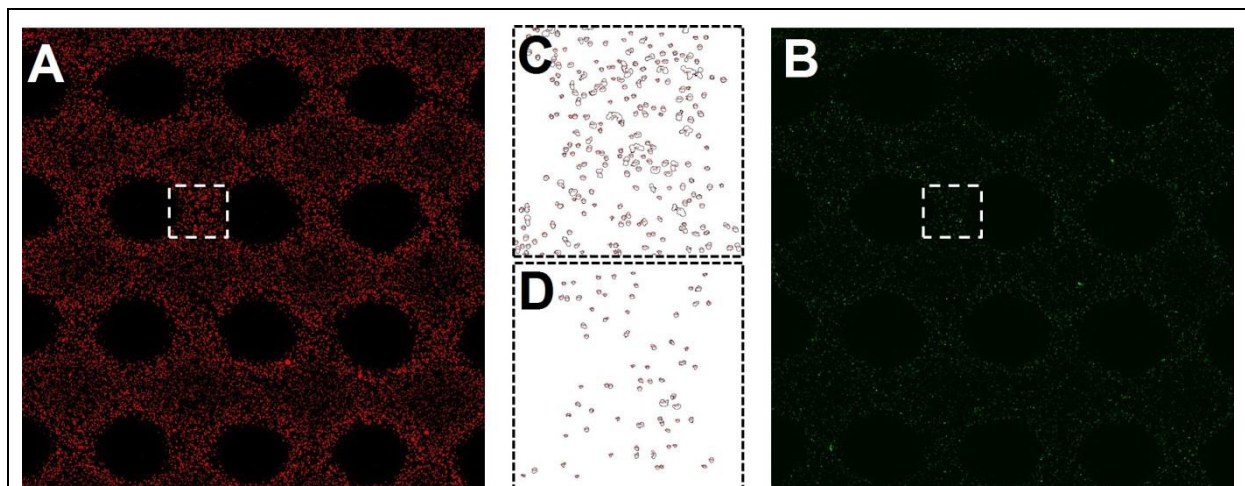


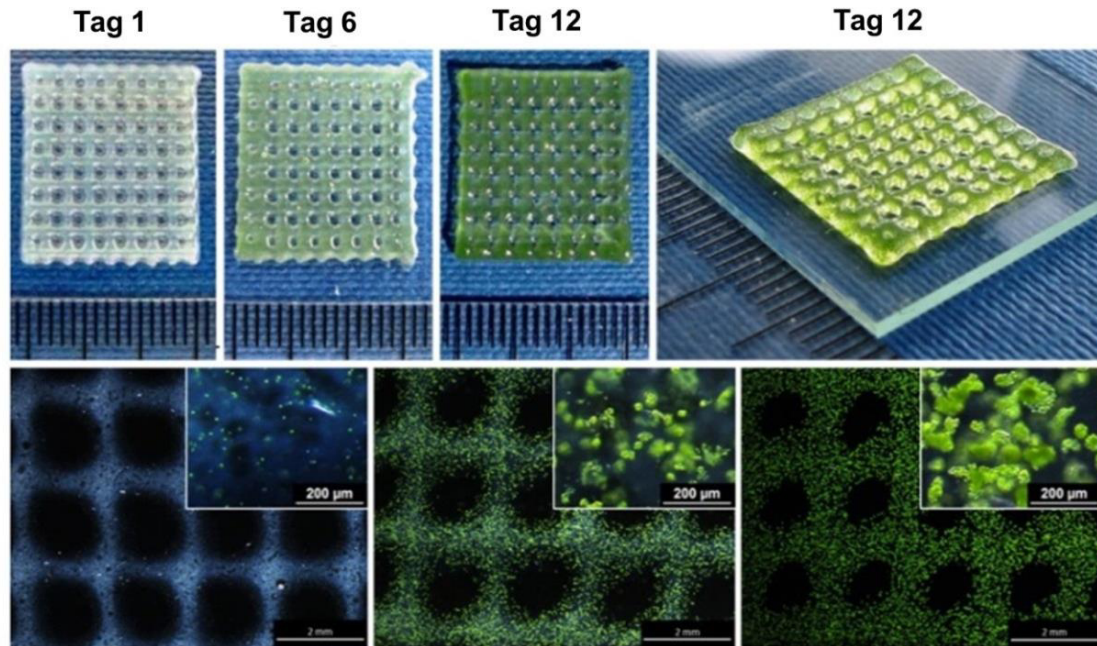
Abbildung 35: Viabilitätsbestimmung von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgenkulturen. (A) Roter Fluoreszenzkanal = Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls (lebende Zellen); (B) SYTOX Green gefärbte Zellen (tote Zellen); (C) Ausschnitt aus Teilbild A; (D) Ausschnitt aus Teilbild B [118].

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Photosynthetisches Wachstum von Mikroalgen in strukturierten Hydrogelen

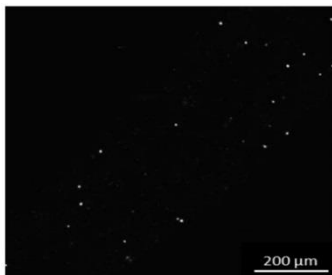
Zunächst wurde mit Hilfe der Methoden aus den Kapiteln 3.2.4 und 3.2.5 untersucht, ob die Mikroalgen nach der mechanischen Beanspruchung während des 3D-Bioprinting-Prozesses und der darauf folgenden Vernetzung des Hydrogelmaterials eine Teilungsfähigkeit unter photoautotrophen Bedingungen aufweisen. *C. reinhardtii* 11.32b wurde laut Kapitel 3.2.4 in das Hydrogelmateriale eingebracht und 4-Schichtstrukturen gemäß Abbildung 33 geplottet. Diese wurden für einen Zeitraum von 12 Tagen unter photoautotrophen Bedingungen (26 °C, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 100 min^{-1}) kultiviert und das Zellwachstum und Zellviabilität verfolgt.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse des Mikroalgenwachstums in strukturierten Hydrogelen dargestellt. Die Anwesenheit der Mikroalgen zeigte keinen negativen Einfluss auf den 3D-Bioprinting-Prozess und die Vernetzung bzw. Stabilität des Hydrogels über den betrachteten Versuchszeitraum von 12 Tagen. Die eingebetteten Mikroalgen wurden homogen über die 4-Schichtstruktur des Hydrogels verteilt und zeigten einen hohen Anteil vitaler Zellen nach einem Tag Kultivierung im TP-Medium. Die hohe optische Transparenz des Hydrogels (Alginate) ermöglichte eine ausreichende Versorgung der Zellen mit PAR-Strahlung. Eine Zunahme der Zellzahl konnte sowohl mikro- als auch makroskopisch belegt werden (Abbildung 36). Nach dem 1. Tag wies das Hydrogel eine hohe Transparenz auf, wohingegen ab dem 6. Inkubationstag eine signifikante Grünfärbung innerhalb des Hydrogels beobachtet wurde. Nach 12 Tagen Kultivierung unter den untersuchten Bedingungen wurde die Bildung photosynthetischer Zellcluster beobachtet. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass nur ein geringer Anteil der Algenzellen durch SYTOX Green gefärbt wurde, weshalb von einer hohen Vitalität der Zellpopulation in der Hydrogelumgebung ausgegangen werden kann. Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde ermittelt, dass die gebildeten Zellcluster einen Durchmesser von ca. 40 - 50 μm aufwiesen. Diese morphologische Entwicklung ist auf die begrenzte Mobilität der Algenzellen in der Hydrogelumgebung zurückzuführen, wodurch die Tochterzellen gezwungen sind in direkter Nähe der Mutterzelle zu verbleiben.

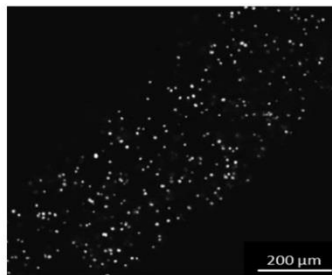


Tag 1

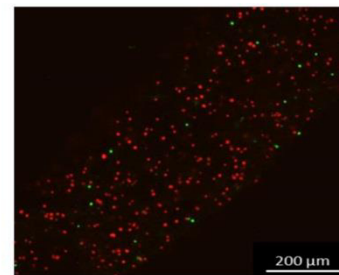
Grünfluoreszenz (525/10 nm)



Rotfluoreszenz (605/15 nm)

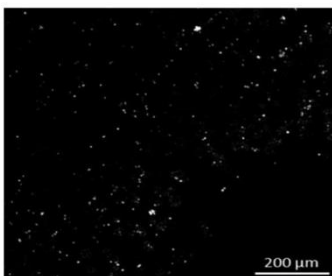


Überlagerung

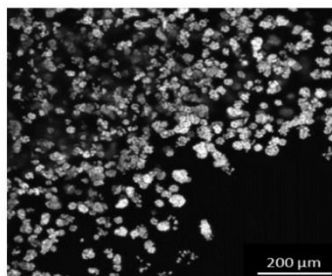


Tag 12

Grünfluoreszenz (525/10 nm)



Rotfluoreszenz (605/15 nm)



Überlagerung

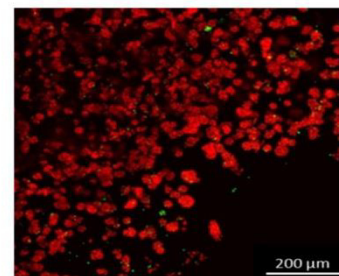
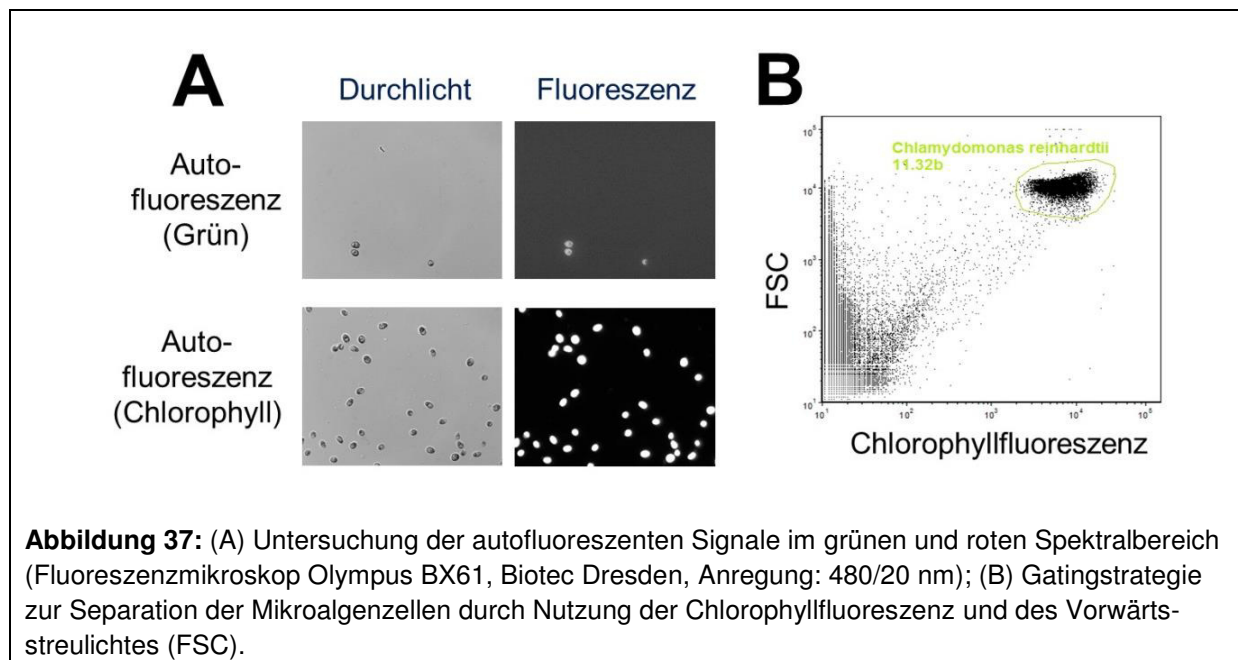


Abbildung 36: (Oben) Makro- und mikroskopische Bestimmung des Wachstums von *C. reinhardtii* 11.32b in 3D-geplotteten Hydrogelen über einen Versuchszeitraum von 12 Tagen unter photoautotrophen Bedingungen (26 °C, 100 rpm, 20 µmol m⁻² s⁻¹); (Unten) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Ermittlung der Viabilität der eingebetteten Mikroalgen, SYTOX Green (525/10 nm)-Tottfärbung, Chlorophyllautofluoreszenz (605/15 nm) für die Gesamtzellzahl und die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle [119].

3.3.2 Validierung der Viabilitätsbestimmung von Mikroalgen-Suspensionskulturen mittels DiBAC₃(4)-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse

In den folgenden Untersuchungen wurde evaluiert, inwiefern sich das Wachstum und die Viabilität von Mikroalgenkulturen in der Hydrogelumgebung von Suspensionskulturen unterscheiden bzw. welchen Einfluss die Einbettung der Mikroalgen auf der zellulären Ebene hat. Dazu war es notwendig Methoden für die quantitative Viabilitätsbestimmung von Suspensionskulturen zu entwickeln und zu evaluieren.

Mikroalgen eignen sich aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften, d.h. vor allem durch die kugelige Form der Zellen mit einem Durchmesser von mehreren Mikrometern und das vorrangige Wachstum als Einzelzellen ideal für durchflusszytometrische Analysen. Der hohe Anteil intrazellulär fluoreszierender Pigmente schränkt zwar die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen ein, weil spektrale Überlappungen zwischen der Autofluoreszenz und der Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe auftreten können. Sie haben allerdings den Vorteil, dass diese Autofluoreszenz als nichtinvasiver Trigger-Parameter genutzt werden kann. Dadurch ist eine sehr gute Separation der Algenzellen von den Rauschsignalen bzw. nichtzellulären Partikeln möglich.



In Abbildung 37 sind die zellulären Autofluoreszenzen im grünen und roten Spektralbereich von *C. reinhardtii* 11.32b bei einer Anregung von 480 nm dargestellt. Im grünen Spektralbereich wurde eine geringe Autofluoreszenz detektiert. Diese schwache Fluoreszenz wird auf das Pigment Rhodopsin zurückgeführt, welches u.a. Bestandteil des photosensitiven Augen-

fleckes von *C. reinhardtii* ist [120]. Die starke rote Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls wird bereits geraume Zeit für das Monitoring des physiologischen Zustandes von photosynthetisch aktiven Organismen genutzt. Die sogenannte PAM-Fluorometrie misst beispielsweise die Effizienz des Photosystem II anhand dieser autofluoreszenten Eigenschaften [121]. Aus Abbildung 37 wird deutlich, dass bei gleicher Verstärkung der Fluoreszenzsignale die Autofluoreszenz des Chlorophylls im roten Spektralbereich die grüne Autofluoreszenz um ein vielfaches übersteigt. Diese spektralen Eigenschaften müssen bei der Auswahl und Evaluation des Fluoreszenzfarbstoffes berücksichtigt werden.

In Kapitel 3.2.3 wurde der anionische Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) bereits vorgestellt. Im Falle depolarisierter Zellmembranen diffundiert der Farbstoff in die Zelle. Durch die Anlagerung an intrazelluläre Membranen und Proteine kommt es zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignales. Um zu evaluieren, ob spektrale Überlappungen zwischen der Autofluoreszenz des Chlorophylls und dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) auftreten, wurden laut Kapitel 3.2.3 depolarisierte Zellen angefärbt und bei einer Anregung von 480 nm fluoreszenzspektrometrisch vermessen.

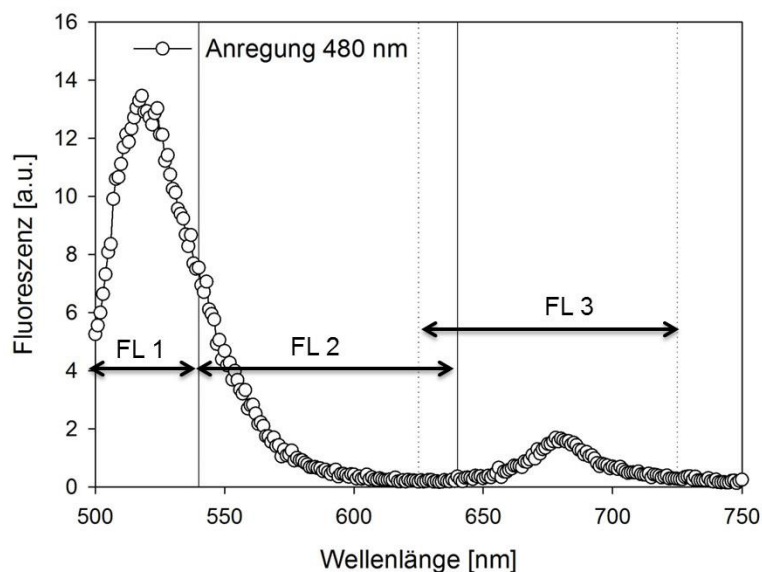


Abbildung 38: Filterkonfiguration im Cube8 Durchflusszytometer zur Detektion der Fluoreszenzsignale: FL1: 520/20, FL2: 590/50, FL3: 675/50. Der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) wird sowohl im FL1- als auch im FL2-Kanal detektiert. Die Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls wird im FL-3 Kanal detektiert.

Abbildung 38 zeigt die erzielten Fluoreszenzsignale im Wellenlängenbereich von 500 - 750 nm und die im Cube8 genutzte Filterkonfiguration für die drei Fluoreszenzkanäle FL1 (520/20), FL2 (590/50) und FL3 (675/50). Das Fluoreszenzsignal des Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC₄(3) wurde im Bereich von 500 - 590 nm detektiert und ist somit sowohl im FL1- als

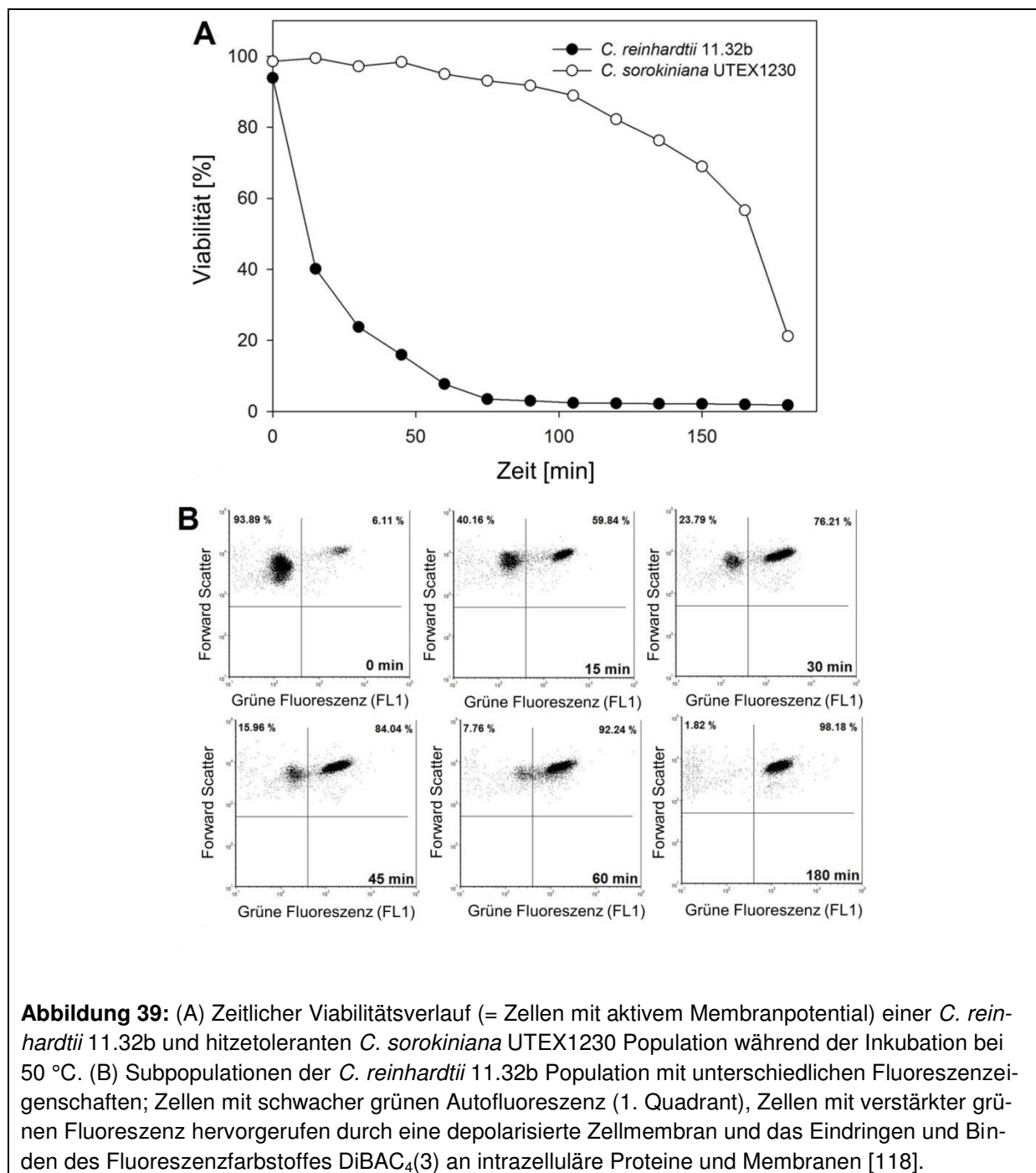
auch im FL2-Kanal des Cube8 sichtbar. Das autofluoreszente Signal von Chlorophyll weist seine maximale Intensität im roten Spektralbereich von 660 - 700 nm auf und ist demnach nur im FL3-Kanal sichtbar. Aufgrund dieser spektralen Eigenschaften ist eine effektive Trennung der beiden Fluoreszenzsignale möglich und eine Kompensation der Signale nicht erforderlich.

Im Folgenden wird die Eignung des membranpotentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC₄(3) für das Viabilitätsmonitoring von Mikroalgenkulturen untersucht. Dazu wurden Kulturen von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 für 180 Minuten bei 50 °C inkubiert und in Intervallen von 15 Minuten laut Kapitel 3.2.3 analysiert. Abbildung 39 zeigt die prozentuale Viabilität bzw. den prozentualen Anteil an Algenzellen mit polarisierter Zellmembran in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bei 50 °C (Abbildung 39A).

In Teilabbildung 39B sind typische Subpopulationsmuster von *C. reinhardtii* 11.32 b im *Forward Scatter* vs. DiBAC₄(3)-Fluoreszenz (grüne Fluoreszenz) Dotplot dargestellt. Die Mikroalgenkultur zeigt zwei Subpopulationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften. Der erste Quadrant (obere linke Ecke) beinhaltet Algenzellen mit ihrer geringen grünen Autofluoreszenz und polarisierter Zellmembran. Aufgrund der Polarität der Membran kann der Farbstoff nicht in die Zellen eindringen. Der zweite Quadrant (obere rechte Ecke) zeigt eine Zellpopulation mit verstärkter Fluoreszenzintensität, die durch eine Depolarisierung der Zellmembran und die damit verbundene DiBAC₄(3)-Färbung verursacht wurde.

Im Verlauf der Inkubation bei 50 °C verschieben sich die Anteile der Subpopulationen hin zu der DiBAC₄(3)-gefärbten Zellpopulation. Für die analysierte *C. reinhardtii* 11.32b Kultur wurde eine initiale Viabilität (ungefärbte Zellen) von 94 % bestimmt. Bereits nach 45 Minuten Inkubationsdauer bei 50 °C zeigten 84 % der Zellen dieser Kultur eine depolarisierte Zellmembran. Nach 60 Minuten wurde für diese *C. reinhardtii* 11.32b Kultur eine Viabilität von lediglich 8 % ermittelt. Der exponentielle Abfall der Populationsviabilität spiegelt die geringe Hitzetoleranz dieses Mikroalgenstammes wieder.

Neben dem Modellorganismus *C. reinhardtii* 11.32b wurde diese Populationsanalyse ebenfalls für die hitzetolerante Mikroalge *C. sorokiniana* UTEX1230 angewandt. Im Gegensatz zu *C. reinhardtii* 11.32b zeigte die *C. sorokiniana* UTEX1230 Kultur nach 45 Minuten Inkubationsdauer bei 50 °C eine konstant hohe Viabilität von 97 %.



In den darauffolgenden 100 Minuten sank die Viabilität der *C. sorokiniana* UTEX1230 Kultur auf ca. 65 % ab und erzielte nach dem Inkubationszeitraum von 180 Minuten eine finale Viabilität von 22 %. Die hohe Toleranz gegenüber Temperaturen bis zu 42 °C von *C. sorokiniana* UTEX1230 wurde bereits in veröffentlichten Arbeiten gezeigt [122, 123] und wird hier durch die Viabilitätsbestimmung anhand des Membranpotentials belegt.

Das Membranpotential von Mikroorganismen wird durch das Ausschleusen von Protonen und die zugrundeliegende Elektronentransportkette generiert. Es wird daher angenommen, dass der Verlust der Polarität der Zellmembran mit einem Verlust der metabolischen Aktivität

einhergeht, weil die zellulären Mechanismen zur Bildung der Reduktionsäquivalente NADH⁺/NADPH⁺ und Adenosintriphosphat nicht aktiv sind.

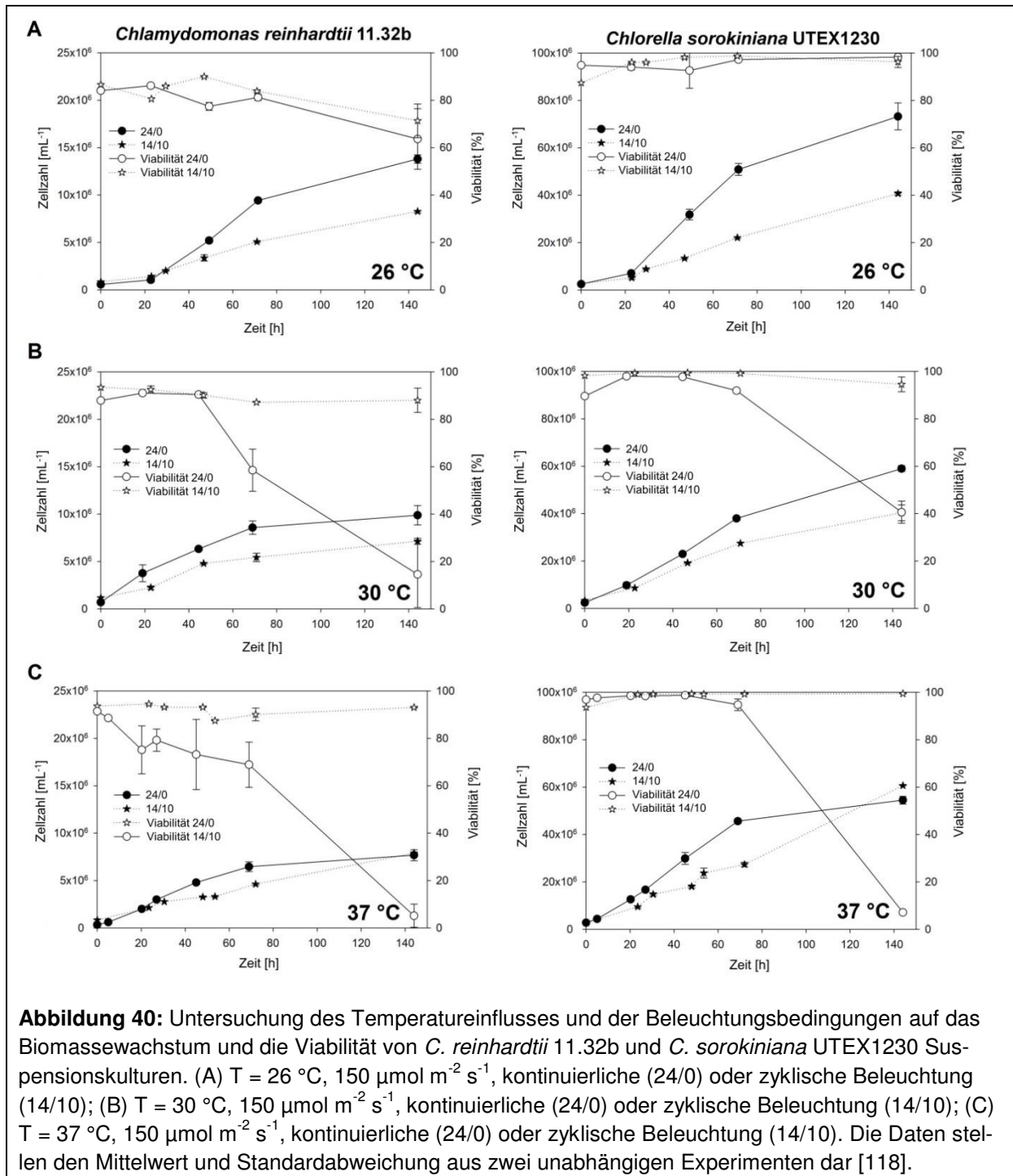
Der anionische Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) wurde bereits in veröffentlichten Studien für die Bestimmung der mikrobiellen Viabilität verwendet. Jedoch wurden dabei bis heute lediglich Hefe- und Bakterienkulturen [124, 125] analysiert. Im Zusammenhang mit phototrophen Organismen wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) bis heute nur für Toxizitätsuntersuchungen bezüglich der Wirkung des Herbizides Paraquat auf die Mikroalge *Chlamydomonas moewussi* [101] bzw. für Viabilitätsuntersuchungen von Phytoplankton genutzt [126]; jedoch nicht für das Monitoring der Populationsverteilung in photobiotechnologischen Prozessen.

Anhand der präsentierten Daten für die beiden Mikroalgenstämme *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 konnte gezeigt werden, dass der physiologische Zustand von Mikroalgenkulturen mit hoher Sensitivität über die Polarität der Zellmembran ermittelt werden kann. Diese Informationen sind essentiell für eine Optimierung der Prozessbedingungen für Mikroalgen, da nur metabolisch aktive Zellen die biokatalytischen Aufgaben erfüllen können.

3.3.3 Einfluss von Temperatur und Beleuchtungszyklen auf die Viabilität von Mikroalgen Suspensionskulturen

Das etablierte Protokoll für die Analyse der Populationsviabilität wurde im Folgenden unter verschiedenen Prozessbedingungen (Temperatur und Beleuchtungszyklen) während des photoautotrophen Wachstums ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) der Mikroalgen *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 in geschüttelten Suspensionskulturen angewendet, um einen Einfluss dieser Parameter auf die Populationszusammensetzung zu untersuchen (Abbildung 40).

Bei Prozessbedingungen von 26 °C und kontinuierlicher Beleuchtung zeigte *C. reinhardtii* 11.32b eine lag-Phase von ca. 20 h bevor ein linearer Anstieg der Zellzahl erfolgte (Abbildung 40A). Unter kontinuierlicher Beleuchtung wurde eine Wachstumsrate von $1,15 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ bestimmt, die unter Hell-/Dunkelzyklen von 14/10 h auf $0,76 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ sank. Die durchschnittliche Viabilität der *C. reinhardtii* 11.32b Vorkulturen lag zwischen 80 - 90 %. Bei einer Temperatur von 26 °C veränderte sich die Populationsverteilung hinsichtlich der Viabilität der Kultur über den Kultivierungszeitraum von 144 h für beide untersuchte Beleuchtungsbedingungen nicht signifikant.



C. sorokiniana UTEX1230 erzielte bei einer Temperatur von 26 °C Wachstumsraten von $1,19 \pm 0,03\text{ d}^{-1}$ für eine kontinuierliche Beleuchtung (24/0 h) und $0,61 \pm 0,03\text{ d}^{-1}$ für Hell-/Dunkel-Zyklen von 14/10 h (Abbildung 40A rechts). Die Vorkulturen von *C. sorokiniana* UTEX1230 bestand aus bis zu 97 % vitalen Zellen mit aktiver polarisierter Zellmembran. Bei 26 °C Kultivierungstemperatur wurde diese hohe Viabilität für beide Beleuchtungsbedingungen über den gesamten Kultivierungszeitraum von 144 h aufrechterhalten.

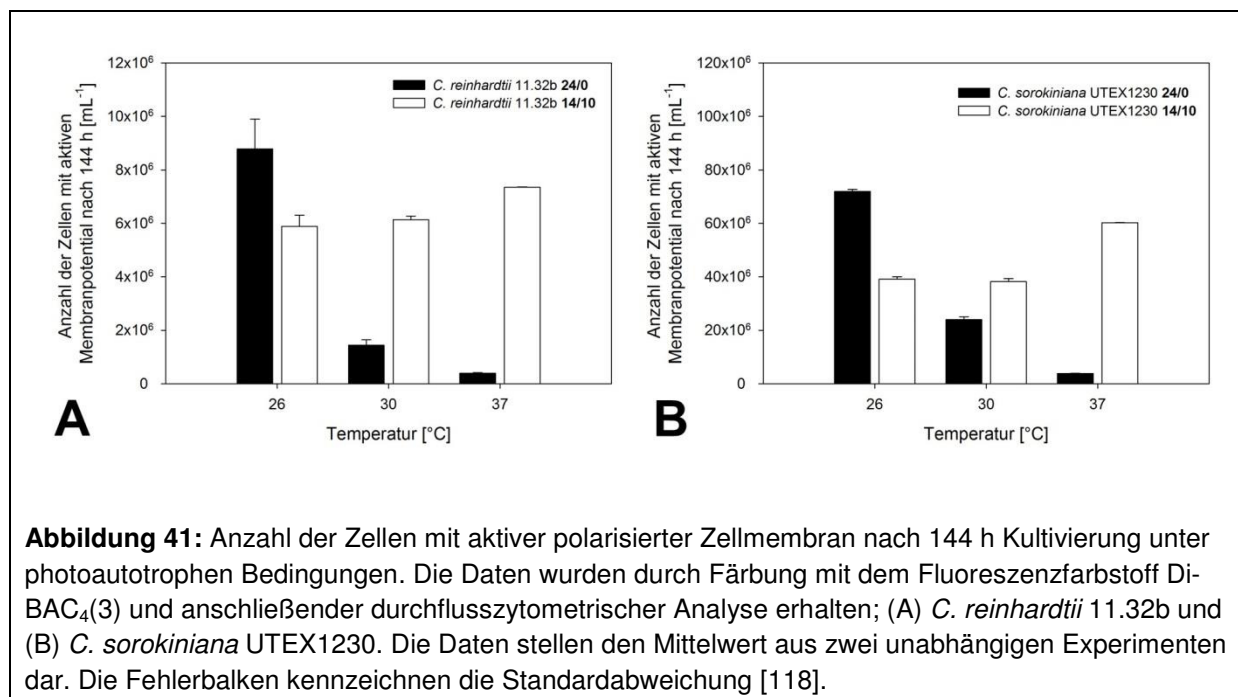
Durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 30 °C reduzierte sich die Wachstumsrate von *C. reinhardtii* 11.32b unter kontinuierlicher Beleuchtung auf $0,48 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ (Abbildung 40B links). Interessanterweise erzielten die zyklisch beleuchteten *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen bei 30 °C eine nahezu identische Wachstumsrate von $0,44 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$. Die Struktur der Subpopulationen zeigte jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Beleuchtungsbedingungen. Bis 45 h wiesen die Kulturen vergleichbar hohe Viabilitäten von ca. 90 % auf. Nach 70 h zeigten die kontinuierlich beleuchteten Kulturen jedoch einen Rückgang der Viabilität auf $58 \pm 9 \%$ und schließlich auf ca. 20 % am Ende des Versuchszeitraumes. Im Gegensatz dazu, erzielten die Kulturen unter zyklischer Beleuchtung (14/10 h) eine konstant hohe Viabilität von über 80 %.

Die hitzetoleranten *C. sorokiniana* UTEX1230 Kulturen erreichten bei 30 °C und kontinuierlicher (24/0 h) bzw. zyklischer Beleuchtung (14/10 h) eine 62 %ige bzw. 55 %ige höhere Wachstumsrate im Vergleich zu *C. reinhardtii* 11.32b unter äquivalenten Prozessbedingungen. Der zeitliche Viabilitätsverlauf zeigte jedoch eine große Ähnlichkeit zu den *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen. Nach 60 h nahm die Viabilität der kontinuierlich beleuchteten *C. sorokiniana* UTEX1230 Kulturen ab und erreichten einen finalen Wert von ca. 40 % am Ende des Versuchszeitraumes. Im Gegensatz dazu wiesen die Kulturen unter zyklischer Beleuchtung eine konstant hohe Viabilität von über 90 % auf.

Der zeitliche Verlauf des Biomassezuwachses der *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen unter kontinuierlicher und zyklischer Beleuchtung bei 37 °C zeigte einen nahezu identischen Verlauf (Abbildung 40C links). Die Wachstumsraten wurden jeweils zu $0,41 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ bestimmt und unterschieden sich damit nicht wesentlich von den Wachstumsraten bei 30 °C. Die kontinuierliche Beleuchtung der *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen bei 37 °C führte zu einer linearen Abnahme der Viabilität auf einen finalen Wert von $5,8 \pm 4,8 \%$ nach 144 h Kultivierung. Nichtsdestotrotz konnte auch bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C die Viabilität der zyklisch beleuchteten *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen auf einem hohen Niveau von über 90 % gehalten werden.

Die Mikroalge *C. sorokiniana* UTEX1230 erzielte bei 37 °C in Abhängigkeit der Beleuchtungsbedingungen Wachstumsraten von $0,81 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ (kontinuierliche Beleuchtung) und $0,37 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ (zyklische Beleuchtung), wobei der zeitliche Viabilitätsverlauf den Ergebnissen bei 30 °C entsprach.

Abbildung 41 fasst die Ergebnisse der Kultivierungsversuche bei variierender Prozesstemperatur und Beleuchtungsbedingungen für *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 zusammen und zeigt die Anzahl an Zellen mL^{-1} mit polarisierter Zellmembran nach 144 h Kultivierung.



Eine kontinuierliche Beleuchtung (schwarze Balken) resultierte in einer signifikanten Verringerung der metabolisch aktiven *C. reinhardtii* 11.32b Zellen mit steigender Prozesstemperatur. Die höchste Zelldichte für *C. reinhardtii* 11.32b wurde bei 26 °C und kontinuierlicher Beleuchtung erzielt. Durch die zyklische Versorgung der PAR-Strahlung (14/10 h) wurde lediglich 67 % dieser Zelldichte erzielt (weiße Balken). Sehr interessante Beobachtungen wurden für die zyklischen Beleuchtungen bei nicht optimalen Prozesstemperaturen für *C. reinhardtii* 11.32b von 30 °C und 37 °C gemacht. Trotz der geringeren Wachstumsraten bei hohen Prozesstemperaturen wurde eine vergleichbare Menge an Zellen mit polarisierter Zellmembran wie unter 26 °C erreicht.

Ein vergleichbarer Trend wurde für die Kulturen von *C. sorokiniana* UTEX1230 beobachtet. Aufgrund morphologischer Unterschiede zu *C. reinhardtii* 11.32b ist die Zellkonzentration von *C. sorokiniana* UTEX1230 bei gleicher optischer Dichte größer. Diese Tatsache wird durch die unterschiedlichen y-Achsen Skalierungen in Abbildung 41 ausgedrückt.

Die Prozesstemperatur und die Art der Bereitstellung der PAR-Strahlung gehören zu den wichtigsten Prozessparametern der Algenkultivierung. In mehreren Studien konnte belegt werden, dass die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die erzielbaren Wachstumsraten [127], die Kohlenhydrat- und Lipidproduktion [128, 129] und die Pigmentbildung [130] hat. Bei den in dieser Studie untersuchten Mikroalgenstämmen *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 unterscheiden sich ihre jeweiligen Temperaturoptima. In der Literatur wird ein optimales photoautotrophes Wachstum von *C. reinhardtii* 11.32b im Temperaturbereich von 25 °C bis 28 °C beschrieben [131]. Für die hitzetolerante Mikroalge *C. sorokiniana* UTEX1230 wird eine hohe photosynthetische Aktivität bis 42 °C berichtet [122, 123, 132].

Die Wahl der Beleuchtungsbedingungen stellt den zweiten wichtigen Aspekt der Prozessbedingungen dar. Zum einen ist die Versorgung der Mikroalgenzellen mit PAR-Strahlung wichtig für die grundlegenden zellulären Prozesse zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten (Elektronentransportkette) und Adenosintriphosphat (Protonengesteuerte ATP-Synthase). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine zyklische Versorgung von Algenzellen mit PAR-Strahlung verringerte Wachstums-, CO₂-Fixierungs- und Substrataufnahmeraten zur Folge hat. Beispielsweise beschrieben Tamburic et al. (2012) ein verringertes Wachstum von *C. reinhardtii* Kulturen unter Hell-/Dunkelzyklen von 12/12 h im Vergleich zu kontinuierlich beleuchteten Kulturen [133]. Für die Mikroalge *Chlorella vulgaris* wurden steigende Phosphat- und CO₂-Aufnahmeraten mit zunehmender Beleuchtungsintensität und Länge der Photoperioden ermittelt [134]. Diese publizierten Beobachtungen sind konsistent mit den Ergebnissen aus dieser Studie. Die reduzierten Wachstumsraten für *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 unter zyklischer Beleuchtung von 14/10 h resultieren demnach direkt aus der reduzierten photosynthetischen Aktivität während der Dunkelphasen.

Für beide Mikroalgenstämme wurde eine Angleichung der Wachstumsraten bei steigender Prozesstemperatur (30 °C und 37 °C) verzeichnet. Diese Beobachtung ist auf die unterschiedlichen Populationsverteilungen in Abhängigkeit der Beleuchtungsbedingungen zurückzuführen. Die Anzahl depolarisierter Zellen nahm unter kontinuierlicher Beleuchtung signifikant zu, wohingegen Kulturen, die zyklischer Beleuchtung ausgesetzt wurden eine sehr homogene Zellpopulation polarisierter Zellen aufwiesen.

Der hohe Anteil depolarisierter Zellen unter kontinuierlicher Beleuchtung kann auf Mechanismen der Photoinhibition zurückgeführt werden. Grundlegend erfolgt eine Klassifizierung in donor- und akzeptorseitige Mechanismen [135]. Keren und Krieger-Liszkay (2011) geben einen Überblick über die möglichen intrazellulären Folgen intensiver Beleuchtung [136]. Die Autoren heben vor allem den Effekt auf das D1 Protein des Photosystem II hervor. Intensive Beleuchtung führt demnach zu einer irreversiblen Konformationsänderung des zentralen Proteins des Photosystem II. Eine hohe *turn-over* Rate wirkt dabei dem Funktionsverlust des D1 Proteins entgegen. Übersteigt jedoch die Destruktionsrate die Regenerationsrate, führt dies zum Funktionsverlust des Photosystems und zum Ausfall des Reaktionszentrums. Die einfallende Strahlung kann dann nicht über die Elektronentransportmechanismen abgeführt werden und bedingt die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, die in der Folge weitere zellschädigende Mechanismen auslösen können.

In der hier vorgestellten Studie wurde die PAR-Strahlung mit einer Intensität von 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zur Verfügung gestellt. Leider gibt es keine standardisierte Messmethode für die Bestimmung der PAR-Intensität bei der Kultivierung von Mikroalgen, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Autoren erschwert wird. In der Literatur sind verschiedene

Intensitätsbedingungen für die Auslösung von Photoinhibitionsmechanismen für den Modellorganismus *C. reinhardtii* beschrieben. Dabei ist zu beachten, dass allein die Angabe der Intensität nur bedingt eine Vergleichsgrundlage darstellt, da die spektrale Zusammensetzung der Lichtquelle einen erheblichen Einfluss hat. Kaltweiße Lichtquellen verzeichnen beispielsweise einen wesentlich größeren Anteil kurzwelliger energiereicher Strahlung als warmweiße Lichtquellen. Aus diesem Grund spielen die Wahl der genutzten Messtechnik und der Ort der Messung eine wichtige Rolle. Ein weiterer Einflussparameter ist das verwendete Medium. Roach et al. (2013) beschreiben, dass die Nutzung von Acetat im üblicherweise verwendeten TAP-Medium die Zellen vor photoinhibitorischen Effekten schützt [137]. Dies ist auf die heterotrophe Wachstumskomponente von *C. reinhardtii* zurück zu führen. Die Autoren induzierten eine Photoinhibition unter $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und die Zugabe von 5 mM Linomycin. Im Vergleich dazu wurden Effekte der Photoinhibition, die sich nachteilig auf das Wachstum und Produktbildung von *C. reinhardtii* auswirken, zwischen 1.000 und $2.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beschrieben [138, 139].

3.3.4 Einfluss von Temperatur und Beleuchtungszyklen auf das Wachstum und die Viabilität von in Hydrogelen immobilisierten Mikroalgenkulturen

Die Immobilisierung von Mikroalgen über das 3D-Bioprinting ermöglicht die Herstellung strukturierter und photosynthetisch aktiver Hydrogele (Abbildung 42). Um die Wachstumseigenschaften der beiden Mikroalgenstämme in der Hydrogelumgebung zu charakterisieren, wurden die zellbeladenen Hydrogele unter äquivalenten photoautotrophen Prozessbedingungen kultiviert, wie die bereits beschriebenen Suspensionskulturen. Die Wachstumsraten wurden laut Kapitel 3.2.5 ermittelt. In Abbildung 43 sind vergleichend die Wachstumsraten der Suspensionskulturen (schwarze Balken) und im Hydrogel immobilisierten Kulturen (rote Balken) von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 in Abhängigkeit der Prozessbedingungen dargestellt.

Die eingebetteten *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen zeigten stabile Wachstumsraten im Bereich von $0,4 - 0,6 \text{ d}^{-1}$ für alle untersuchten Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen. Im Vergleich dazu, wies das Wachstum der Suspensionskultur eine starke Abhängigkeit von den eingestellten Prozessbedingungen auf, die sich durch eine Abnahme der Wachstumsrate mit steigender Temperatur äußerte.

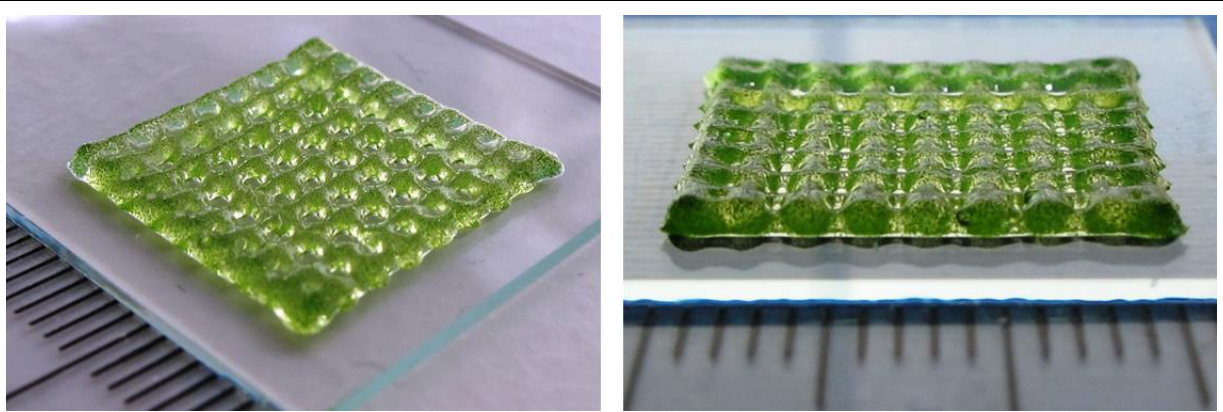


Abbildung 42: Darstellung eines mikroalgenbeladenen Hydrogels. Die Bildung der photosynthetisch aktiven Zellcluster in der Matrixumgebung ist auf makroskopischer Ebene sichtbar (Fotos: Sophie Brüggemeier, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenks- und Weichgewebeforschung).

Bei einer Kultivierungstemperatur von 26 °C, dem optimalen Temperaturbereich für *C. reinhardtii* 11.32b, erreichten die in Hydrogel eingebetteten Kulturen eine 50 % geringere Wachstumsrate im Vergleich zu den Suspensionskulturen. Unter zyklischer Beleuchtung von 14/10 h wurde für die Suspensionskulturen und die immobilisierten Kulturen durchschnittliche Wachstumsraten von $0,76 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ bzw. $0,6 \pm 0,04$ berechnet, ein Unterschied von lediglich 21 %. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 30 °C konnten nahezu identische Wachstumsraten für beide Kultivierungsformen unabhängig von den eingestellten Beleuchtungsbedingungen erzielt werden.

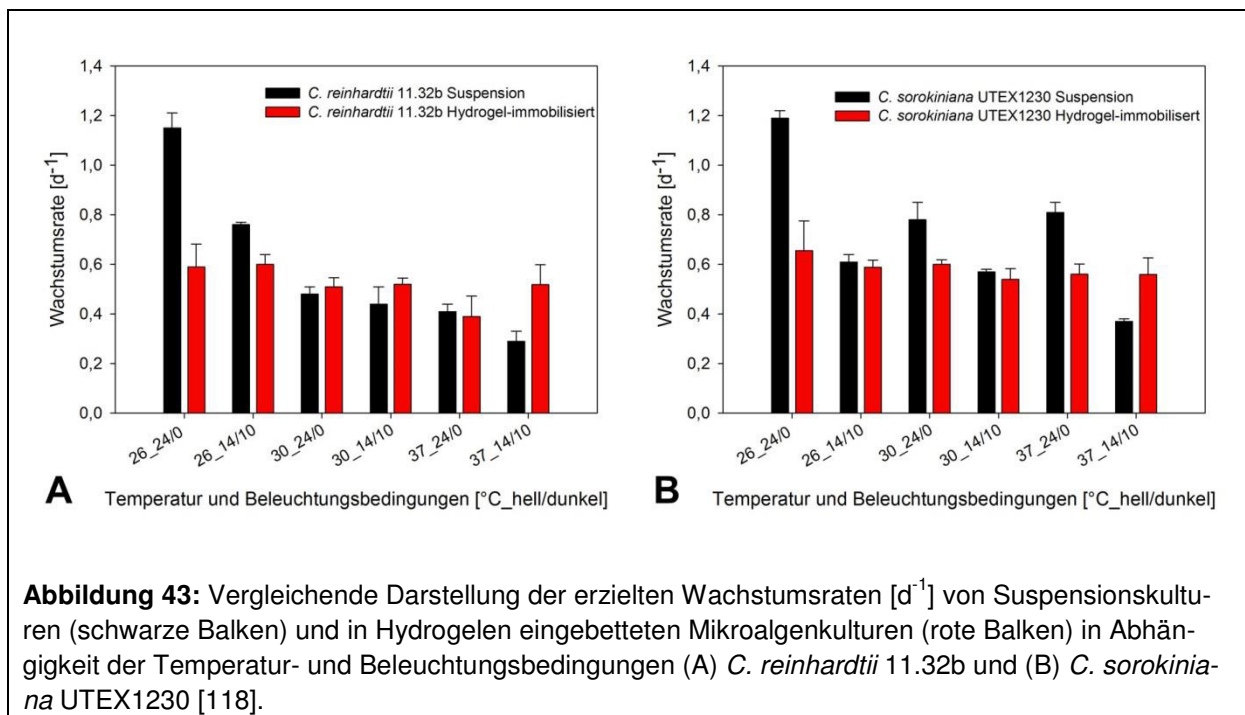


Abbildung 43: Vergleichende Darstellung der erzielten Wachstumsraten [d^{-1}] von Suspensionskulturen (schwarze Balken) und in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgenkulturen (rote Balken) in Abhängigkeit der Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen (A) *C. reinhardtii* 11.32b und (B) *C. sorokiniana* UTEX1230 [118].

Sehr interessante Ergebnisse zeigten die Wachstumsraten für *C. reinhardtii* 11.32b unter nicht optimalen Temperaturbedingungen von 37 °C. Unter kontinuierlicher Beleuchtung wurden in etwa vergleichbare Wachstumsraten von ca. 0,4 d⁻¹ identifiziert. Für die Kultivierung bei zyklischer Beleuchtung erreichten die in Hydrogelen eingebetteten Kulturen eine 44 % höhere Wachstumsrate im Vergleich zur äquivalenten Suspensionskultur.

Im Vergleich zu *C. reinhardtii* 11.32b erzielten die Suspensionskulturen (Abbildung 43B, schwarze Balken) der hitzetolerante Mikroalge *C. sorokiniana* UTEX1230 bei 30 °C und 37 °C signifikant höhere Wachstumsraten. Die im Hydrogel eingebetteten Kulturen (Abbildung 43B, rote Balken) zeigten ebenfalls ein stabiles Wachstum mit Wachstumsraten von 0,5 - 0,7 d⁻¹. Hierbei wurde ein vergleichbarer Trend zu *C. reinhardtii* 11.32b gefunden, weil die immobilisierte *C. sorokiniana* UTEX1230 Kultur bei 37 °C und zyklischer Beleuchtung ebenfalls eine 34 % höhere Wachstumsrate erreichte als die äquivalente Suspensionskultur.

Die transparenten Eigenschaften und das flache geometrische Design des Alginate-Hydrogels ermöglichten die fluoreszenzmikroskopische Analyse der eingebetteten Mikroalgenzellen. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchung für die immobilisierten Mikroalgenkulturen nach 144 h Kultivierung im Vergleich zu den Suspensionskulturen von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 zusammen.

Tabelle 5: Viabilität von Mikroalgen Suspensions- und Hydrogel-immobilisierten Kulturen (3D-Bioprinting-Prozess) unter variierenden Temperatur (26 °C, 30 °C, 37 °C) und Beleuchtungsbedingungen (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kontinuierliche Beleuchtung 24/0 h oder Hell-/Dunkelzyklen von 14/10 h) nach 144 h Kultivierung.

	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 11.32b		<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX1230	
Hell-/Dunkelzyklus				
26°C	24/0*	14/10	24/0	14/10
Viabilität Suspension [%]	63,6 \pm 12,8	71,3 \pm 7,1	98,3 \pm 1,0	96,3 \pm 2,3
Viabilität immobilisiert [%]	\approx 90 %	\approx 85 %	\approx 90 %	\approx 80 %
Hell-/Dunkelzyklus				
30°C	24/0	14/10	24/0	14/10
Viabilität Suspension [%]	14,6 \pm 14,0	86,0 \pm 2,2	40,6 \pm 4,7	94,5 \pm 3,1
Viabilität immobilisiert [%]	\approx 80 %	\approx 80 %	\approx 40 %	\approx 75 %
Hell-/Dunkelzyklus				
37°C	24/0	14/10	24/0	14/10
Viabilität Suspension [%]	5,2 \pm 4,8	93,0 \pm 0,24	7,1 \pm 0,25	99,4 \pm 0,06
Viabilität immobilisiert [%]	\approx 80 %	\approx 85 %	\approx 30 %	\approx 75 %

* Hell-/Dunkelzyklen von 24/0 h repräsentieren kontinuierliche Beleuchtung.

Zwei interessante Aspekte wurden aus der Viabilitätsbestimmung der in Hydrogelen eingebetteten Kulturen gewonnen. Erstens, die Viabilität der *C. reinhardtii* 11.32b Kultur konnte auf einem konstant hohen Niveau von 80 - 90 % aufrecht erhalten werden, unabhängig von den eingestellten Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen. Zweitens, die eingebetteten *C. sorokiniana* UTEX1230 Kulturen zeigten nach dem Versuchszeitraum von 144 h eine geringere Viabilität im Vergleich zu den immobilisierten *C. reinhardtii* 11.32b Kulturen. Zudem konnte in der Hydrogelumgebung keine signifikante Verbesserung der Viabilität unter kontinuierlicher Beleuchtung für *C. sorokiniana* UTEX1230 erzielt werden. Bei Temperaturen von 30 °C und 37 °C ergaben sich Viabilitäten von 40 % und 30 %. Unter zyklischer Beleuchtung erreichten die *C. sorokiniana* UTEX1230 Kulturen bei allen Temperaturbedingungen jeweils eine Viabilität zwischen 75 % und 80 %.

Wie bereits einleitend betrachtet, stellt Alginate aufgrund der transparenten Eigenschaften und der einfachen Handhabung das bevorzugte Material für die Immobilisierung von Mikroalgen dar [108]. Die üblicherweise angewandte Herstellung von Alginatebeads weist Limitationen hinsichtlich der strukturellen Organisation auf. Im Gegensatz dazu ermöglicht die in dieser Arbeit vorgestellte Methode des *Green Bioprintings* die zielgerichtete Einbettung von Mikroalgen in eine strukturell definierte Hydrogelumgebung. Diese Technologie kann durch die Möglichkeit der Geometriebeeinflussung Fortschritte für die Verbesserung der Licht- und Nährstoffversorgung von immobilisierten Algenzellen liefern, weil das Oberfläche/Volumen-Verhältnis variiert werden kann. Zwei Aspekte, die bei der Übertragung der Methode auf andere Mikroalgenstämme bzw. Spezies berücksichtigt werden müssen, sind die mechanische Belastung während des Extrusionsprozesses und die Biokompatibilität der genutzten Hydrogelmaterialien. Diese zwei Parameter müssen jeweils an die Bedürfnisse der genutzten (Mikro-) Organismen angepasst und optimiert werden. In dieser Studie wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden in Kombination mit einer Fiji-basierten Bildanalyse entwickelt, um den physiologischen Zustand der eingebetteten Algenzellen zu evaluieren. Der negative Effekt der kontinuierlichen Beleuchtung auf die Populationsviabilität, welcher für die Suspensionskulturen beobachtet wurde, konnte durch die Einbettung der Zellen in die strukturierte Hydrogelmatrix verringert werden. Eine Ursache für die höhere Viabilität der eingebetteten Zellen ist die intensitätsmindernde Wirkung der Hydrogelmatrix. Die Zellen sind in der Hydrogelumgebung geringeren Lichtintensitäten ausgesetzt als ihre äquivalenten Suspensionskulturen. Zudem bedingt die Bildung von Zellclustern eine weiteren Reduzierung der Lichtintensität für einzelne Zellen.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass durch das intensive Wachstum beider Mikroalgenstämme in der Hydrogelmatrix im Kultivierungsverlauf Limitationsbedingungen hinsichtlich der Licht- aber auch der Nährstoffversorgung auftraten, wenn die Substratverbrauchsraten

die Diffusionsraten durch die Porenstruktur des Hydrogels übersteigen. Dies könnte eine Begründung für die annähernd konstanten Wachstumsraten sein, die für beide Mikroalgenstämme erzielt wurden. Ein vergleichbarer Effekt wurde durch Pane et al. für in Alginatebeads immobilisierte *Tetraselmis suecica* Kulturen beschrieben [140].

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

In der dieser Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des 3D-Bioprintings Mikroalgen homogen in einer strukturierten Hydrogelmatrix immobilisiert werden können. Die Mikroalgen überlebten den Extrusionsprozess und zeigten eine hohe Viabilität nach 24 h Inkubation unter photoautotrophen Bedingungen. Die im Kultivierungsverlauf innerhalb der Hydrogelmatrix gebildeten Zellcluster zeigten eine hohe photosynthetische Aktivität und Viabilität.

Darauffolgend wurden die Wachstumsraten und die Viabilität von zwei phototrophen Modellorganismen, *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230, in der Hydrogelumgebung vergleichend zu äquivalent behandelten Suspensionskulturen evaluiert. Für beide Kulturtypen wurden Methoden zur Bestimmung der Viabilität entwickelt. Die Zusammensetzung der Zellpopulation von Suspensionskulturen wurde über eine membranpotentialabhängige Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff DiBAC₄(3) und anschließende durchflusszytometrische Analyse realisiert. Der physiologische Zustand der immobilisierten Zellen wurde mittels des nichtmembrangängigen Fluoreszenzfarbstoffes SYTOX Green, die Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls und eine anschließende Fiji-basierte Bildanalyse quantifiziert.

Die Kultivierung der Mikroalgen in Form suspendierter Kulturen ergab eine starke Abhängigkeit der Populationsviabilität und der Wachstumsrate von der Prozesstemperatur ($\mu = 0,3 \text{ d}^{-1} - 1,2 \text{ d}^{-1}$) und den Beleuchtungszyklen, wobei zyklisch beleuchtete Kulturen homogene Zellpopulationen mit intakter polarisierter Zellmembran hervorbrachten.

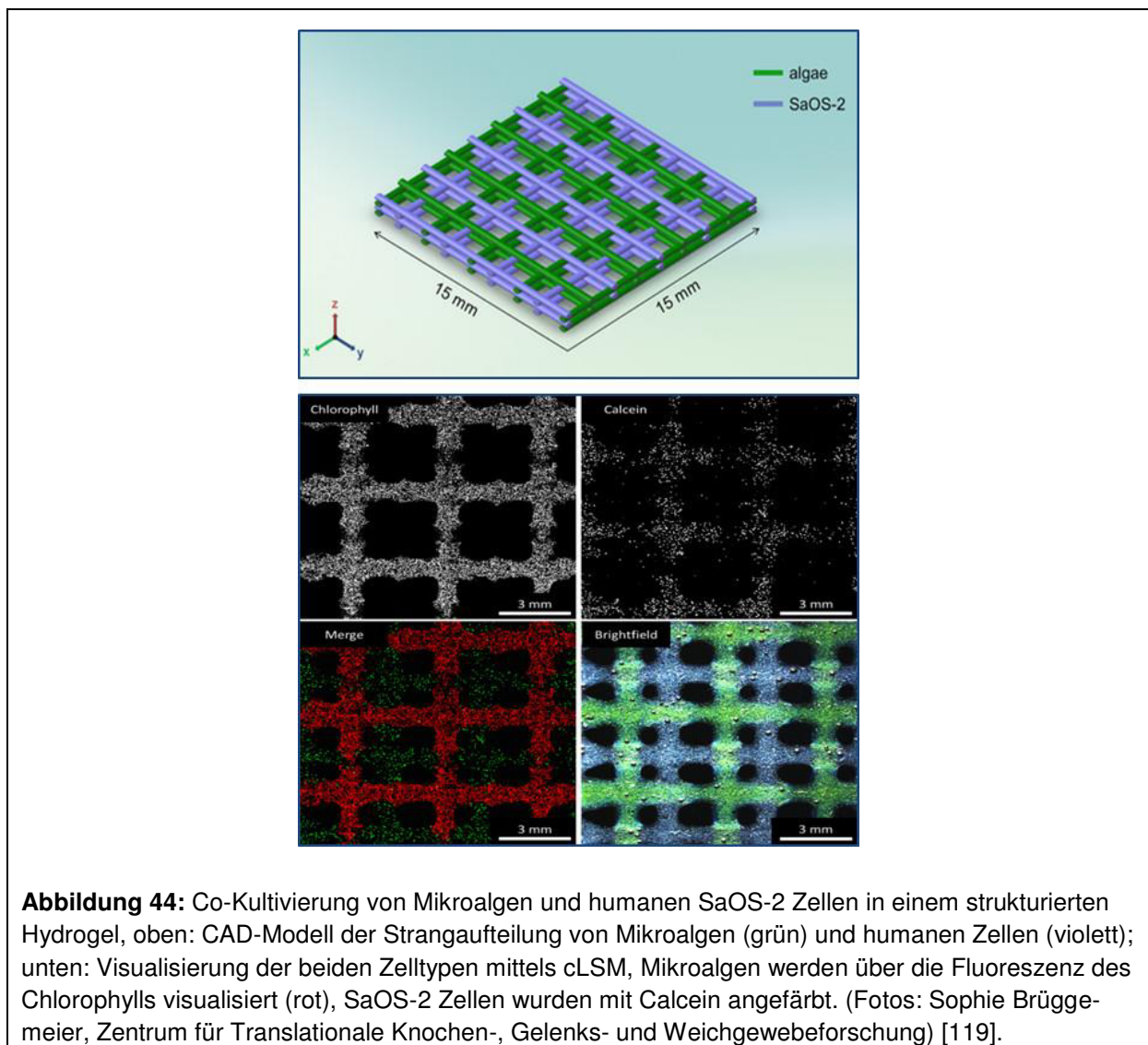
Immobilisierte Mikroalgenkulturen zeigten stabile Wachstumsraten zwischen $0,4 \text{ d}^{-1} - 0,7 \text{ d}^{-1}$, unabhängig von der Prozesstemperatur und den eingestellten Beleuchtungszyklen. Dabei erzielten die in Hydrogelen immobilisierten Kulturen bei Prozesstemperaturen von 37 °C und zyklischer Beleuchtung höhere Wachstumsraten als die entsprechenden Suspensionskulturen. Die Viabilität der eingebetteten Mikroalgenkulturen konnte bei einer PAR-Intensität von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu den Suspensionskulturen signifikant verbessert werden.

Die Technologie des 3D-Bioprintings ermöglicht zahlreiche Applikationen in der Grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung. Da die Eigenschaften der Hydrogelmatrix durch die Wahl der Materialien und die Parameter des Herstellungsprozesses beeinflusst werden können, ist eine detaillierte Untersuchung von Bioprozessen sowohl auf der Mikroebene (z.B.

Viabilität, Morphologie, Aggregationsverhalten) als auch auf der Makroebene (Einfluss verschiedener Prozessparameter auf Wachstums und Produktivität) möglich.

Das 3D-Bioprinting kann auf weitere Organismen erweitert werden und bietet somit die Möglichkeit eines Modellsystems für symbiotisch lebende Organismen bzw. der Untersuchung der zellulären Wechselwirkungen und Interaktionen. Für biotechnologische Anwendungen ist die Etablierung von Kaskadenreaktionen denkbar, indem die Stoffwechselleistung verschiedener Zelltypen für die stufenweise Synthese eines Zielproduktes genutzt werden.

Abbildung 44 zeigt das *Proof of Concept* einer ersten potentiellen Applikation des *Green Bioprintings* im Bereich des *Tissue Engineerings*. Hierbei wurden humane SaOS-2 Zellen (Osteoblasten) in eine strukturierte Co-Kultur mit der Mikroalge *C. reinhardtii* gebracht, um sauerstofflimitierende (hypoxische) Bedingungen der humanen Zellen zu verhindern.



4. Entwicklung eines miniaturisierten Laborkultivierungssystems für Mikroalgen mit optischem Prozessmonitoring (MicroLED-Bioreaktor)

4.1 Einleitung

4.1.1 Lichttechnologien in der Photobiotechnologie

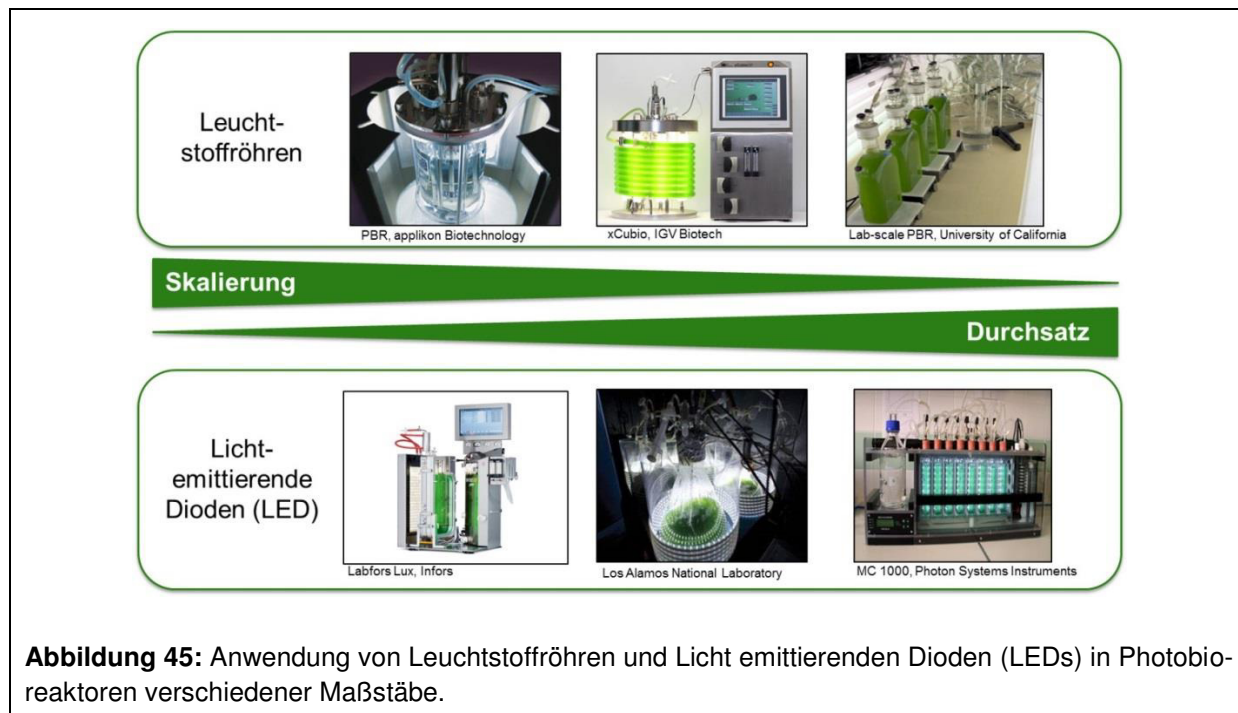
In der Einleitung wurden bereits einige Lichttechnologien vorgestellt, die in der Photobioreaktortechnik Anwendung finden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Lichttechnologien und ihre Eigenschaften. Zurzeit sind Leuchtstoffröhren und Lichtemittierende Dioden (LEDs) die am weitesten verbreiteten künstlichen Lichtquellen sowohl für kommerziell erhältliche Photobioreaktoren (PRB) als auch für selbstkonzipierte Laborkultivierungssysteme (Abbildung 45).

Tabelle 6: Vergleichende Übersicht über Lichttechnologien mit ihrer Effizienz und Lebensdauer [141].

Lichtquelle	Lebensdauer [h]	Effizienz [lumen W ⁻¹]
Glühlampe	750 - 1.500	12 - 18
Halogenstrahler	2.000 - 4.000	16 - 29
Leuchtstoffröhre	20.000	80 - 100
Kompaktleuchtstoffröhre	6.000 - 10.000	60 - 70
Weißer LED	50.000	90 - 100
Weißer OLED	10.000 - 15.000	64

Im Kleinkultivierungsmaßstab sind vor allem die geometrischen Abmessungen der künstlichen Lichtquelle, die Möglichkeiten zur Ansteuerung und Regulierung bzw. die Wärmecharakteristika und das damit verbundene thermische Management zur Abfuhr der entstehenden Wärme entscheidend für das Design von miniaturisierten PBRs. Leuchtstoffröhren sind aufgrund ihrer geometrischen Abmessungen zumeist ungeeignet für die Integration in miniaturisierte PBR-Laborkultivierungssysteme. Im Gegensatz dazu sind LEDs sowohl hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften als auch in Bezug auf ihre Größe eher für die Anwendung in miniaturisierten PBRs geeignet [142]. Allerdings weist auch die LED-Technologie einige zu berücksichtigende Nachteile auf. Die hohen erzielbaren Lichtintensitäten gehen einher mit einer hohen Kühlleistung, die für die Wärmeabfuhr an den Halbleitermaterialien realisiert werden muss. Des Weiteren wird das emittierte Licht in Form einer Punktlichtquelle zur Ver-

fügung gestellt, weshalb die Integration zusätzlicher Homogenisierungselemente notwendig ist.



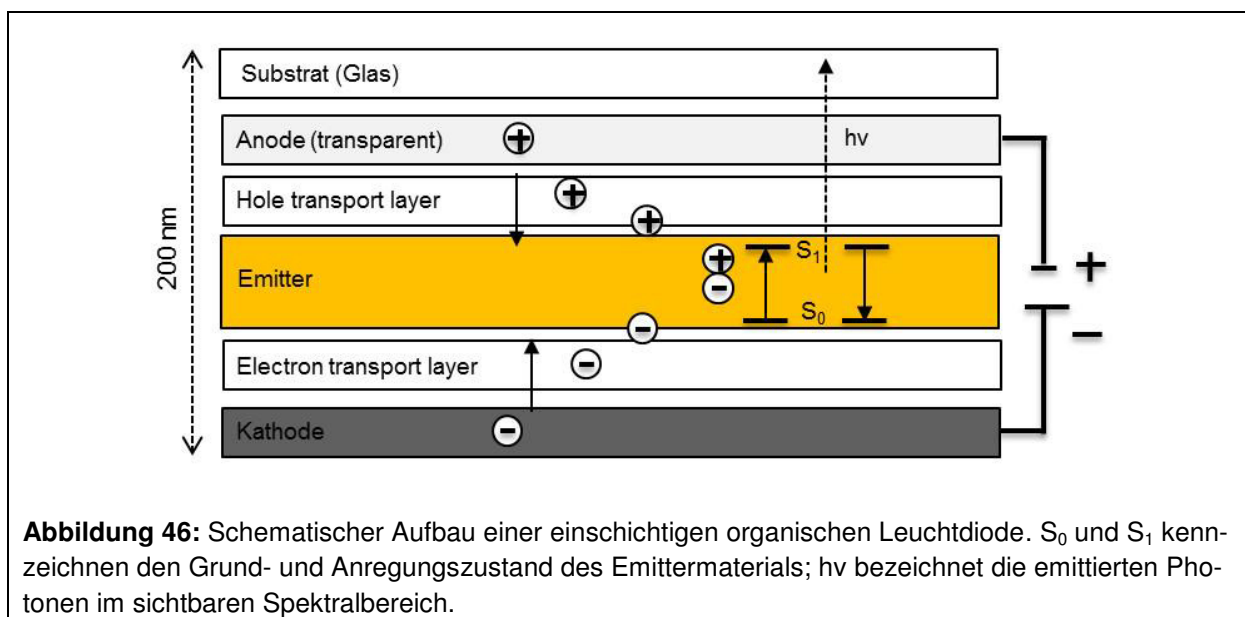
4.1.2 Organische Elektronik: OLED-Technologie

Die organische Elektronik ist ein aufstrebendes Wissenschaftsgebiet mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Am bekanntesten sind organische Leuchtdioden (OLEDs), die vor allem in der Unterhaltungselektronik in Form von Displays (Smartphone, Tablets, OLED-Fernseher) breite Anwendung finden [143]. Neben der Umwandlung von Strom in Licht auf der Basis organischer Emitter gehört auch die organische Photovoltaik, d.h. die Umwandlung von Licht in Strom, und organische Feldeffekttransistoren zu aktuellen Forschungsschwerpunkten der organischen Elektronik in Deutschland [144].

Organische Leuchtdioden haben im Verlauf der letzten Jahre den Transfer aus der Forschung in die kommerzielle Anwendung vollzogen. Neben der Displayanwendung erschließen die OLEDs nun auch verschiedene Beleuchtungsapplikationen [143]. Die Lichterzeugung in organischen Dioden beruht auf dem Prinzip der Elektrolumineszenz [145]. Zwischen zwei Elektroden, von denen mindestens eine transparent ist, werden dünne Schichten organischer Halbleitermaterialien aufgebracht (Abbildung 46). Für einseitig abstrahlende OLEDs wird zumeist transparentes Indiumzinnoxid (ITO) als Anodenmaterial verwendet. Die Anode ist direkt mit der Lochleitungsschicht (engl. *hole transport layer*) verbunden, die den Übergang von Defektelektronen, auch als Löcher bezeichnet, aus der Anode begünstigt. Die Kathode zeichnet sich durch eine geringe Elektronenaustrittsarbeit aus und besteht aus einem Metall (z.B. Calcium oder Aluminium) oder einer Legierung. Um den Eintritt der Elektronen in

die organischen Schichten zu ermöglichen, folgt kathodenseitig eine so genannte Elektronentransportschicht (engl. *electron transport layer*). Eingebettet in die beiden Transportschichten befindet sich das organische Emittermaterial, welches entweder aus einer polymeren Substanz oder Monomeren, sogenannten „*small molecules*“, besteht. Die organischen Schichten sind aufgrund von Oxidationsvorgängen sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und Sauerstoff, weshalb üblicherweise eine DünnschichtverkapSELUNG erfolgt.

Durch das Anlegen einer Spannung werden anoden- (Defektelektronen) und kathodenseitig (Elektronen) Ladungsträger in die Transportschichten injiziert und wandern entlang des Feldgradienten zur gegenüberliegenden Elektrode [145]. Organische Halbleiter weisen eine signifikant geringere Leitfähigkeit im Vergleich zu anorganischen Halbleitern auf. Der Ladungstransport durch die organischen Schichten erfolgt dabei durch den so genannten „*Hopping-Prozess*“ entlang isolierter Moleküle oder Polymerketten und wird bestimmt durch die Energieniveaus des höchsten besetzten (*highest occupied molecular orbital*) und des niedrigsten unbesetzten (*lowest unoccupied molecular orbital*) Molekülorbitals.



In der Emitter- oder auch Rekombinationsschicht können Elektronen und Löcher rekombinieren und einen angeregten Zustand, ein Exziton, ausbilden. Durch den Zerfall dieses Zustandes wird Energie freigesetzt, die zur Anregung des Emitters genutzt wird. Man unterscheidet fluoreszierende und phosphoreszierende Emitter. Bei der Anregung fluoreszierender Emitter gehen 75 % der Anregungsereignisse in einen Triplett-Zustand über. Da nur aus dem Singulett-Zustand die Anregungsenergie durch Abgabe von Photonen mit einer Wellenlänge im sichtbaren Spektralbereich in den Grundzustand zurück fällt, erreichen fluoreszierende Emitter nur einen intrinsischen Wirkungsgrad von 25 % [145]. Aus diesem Grund ist die Entwicklung langlebiger phosphoreszierender Emitter Gegenstand aktueller Forschung [146].

Ein wichtiger Vorteil organischer Leuchtdioden gegenüber anorganischen Halbleitern ist die Möglichkeit, einfache Siebdruck- oder Nassabscheidungsverfahren für das Aufbringen der einzelnen funktionellen polymeren Schichten nutzen zu können, wodurch die Herstellung großflächiger bzw. strukturell beliebiger Bauteile ermöglicht wird. Zudem können verschiedene Substrate, z.B. Glas, Silizium oder Folien als Trägermaterial für die organischen Emitter dienen. Dadurch wird die Herstellung flexibler Lichtquellen möglich (Abbildung 47).

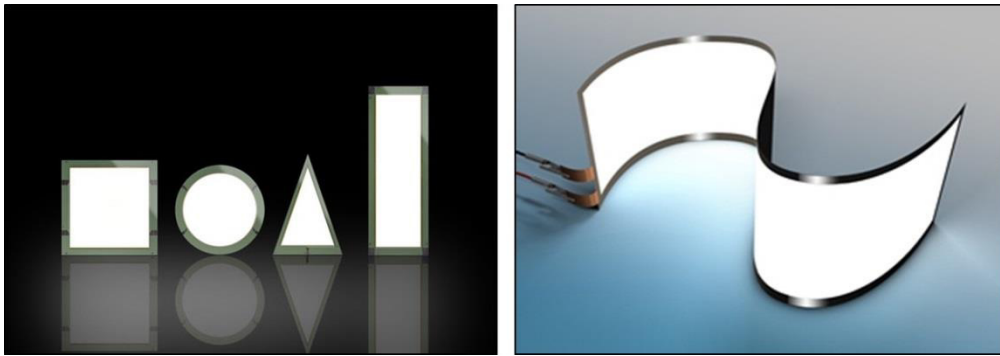


Abbildung 47: Organische Leuchtdioden (OLEDs) können in beliebiger Geometrie hergestellt werden (links, Bildquelle: Philipps Lumiblade OLEDs, architonic.com). Durch die Verwendung flexibler Substratmaterialien sind auch flexible Lichtquellen möglich (rechts, Bildquelle: schott.com).

Eine erste biotechnologisch-medizinische Anwendung von OLED-Microarrays wurde durch Steude et al. (2015) beschrieben [147]. Die Autoren nutzten eine OLED Lichtquelle als biophotonische Plattform, um hochaufgelöste Untersuchungen zur zeitlichen und örtlichen Phototaxis am Beispiel von *C. reinhardtii* zu demonstrieren.

4.1.3 Materialien und Fertigungstechnologien

Bioreaktoren sind aus einem Gefäß zur Kultivierung der Organismen und der dazugehörigen Reaktorperipherie aufgebaut. Im Labormaßstab bestehen die Reaktorgefäße zumeist aus sterilisierbarem Glas, umgeben von einer Peripherie aus Edelstahl. Die Verwendung von reinen Edelstahlkesseln im Labormaßstab ist eher selten und findet erst im Pilot- oder Produktionsmaßstab Anwendung. Ein aktueller Trend geht zur Verwendung von Einwegbioreaktoren, deren Reaktorgefäß entweder aus einem transparenten vorsterilisierten Kunststoff oder aus Einwegbeuteln besteht [148]. Die Fertigung von Bioreaktorkomponenten aus Edelstahl mittels klassischer Fertigungstechnologien ist ein kosten- und zeitintensiver Prozess. Zudem ist die Komplexität der Bauteile erheblich von den Spezifikationen der verwendeten Werkzeuge abhängig.

Die Entwicklung additiver Fertigungsverfahren ermöglicht einen neuen Freiheitsgrad in der Konstruktion von Bauteilen - die Komplexität. Der umgangssprachlich auch als 3D-Druck bezeichnete Prozess ermöglicht die Bauteilfertigung auf Basis von 3D-Konstruktionsdateien.

Die Bauteile werden Schicht für Schicht aus einem pulverförmigen Werkstoff aufgebaut. Zum aktuellen Stand der Entwicklung können sowohl eine Vielzahl von Kunststoffen, Metalle, Keramiken als auch Polymergipse und Harze mit Hilfe dieser Fertigungstechnologie verarbeitet werden. Der 3D-Druck umfasst eine breite Palette an Fertigungsmethoden [149], weshalb im folgenden Abschnitt die zurzeit wichtigsten Technologien, die zukünftig auch einen erheblichen Beitrag im Bereich der Biotechnologie liefern können, vorgestellt werden.

4.1.4 Übersicht über additive Fertigungsverfahren

4.1.4.1 3DP-Verfahren

Das 3DP (3D-Printing)-Verfahren hat der additiven Fertigung das Synonym „3D-Druck“ verliehen. Beim 3DP-Prozess wird pulverförmiger Polymergips von einer Walze (1) in einer dünnen Schicht auf einer Druckplatte verteilt (Abbildung 48). Die Tintenstrahldruckköpfe (2, 4) drucken ein Bindematerial in das Pulver, wodurch sich die Materialien verbinden und aushärten. Nach dem geringfügigen Absenken der Druckplatte (3) wird die nächste Schicht aufgebaut, bis das 3D-Bauteil fertiggestellt ist. Am Ende des Druckprozesses wird das ausgehärtete Bauteil vom überschüssigen Pulver befreit.

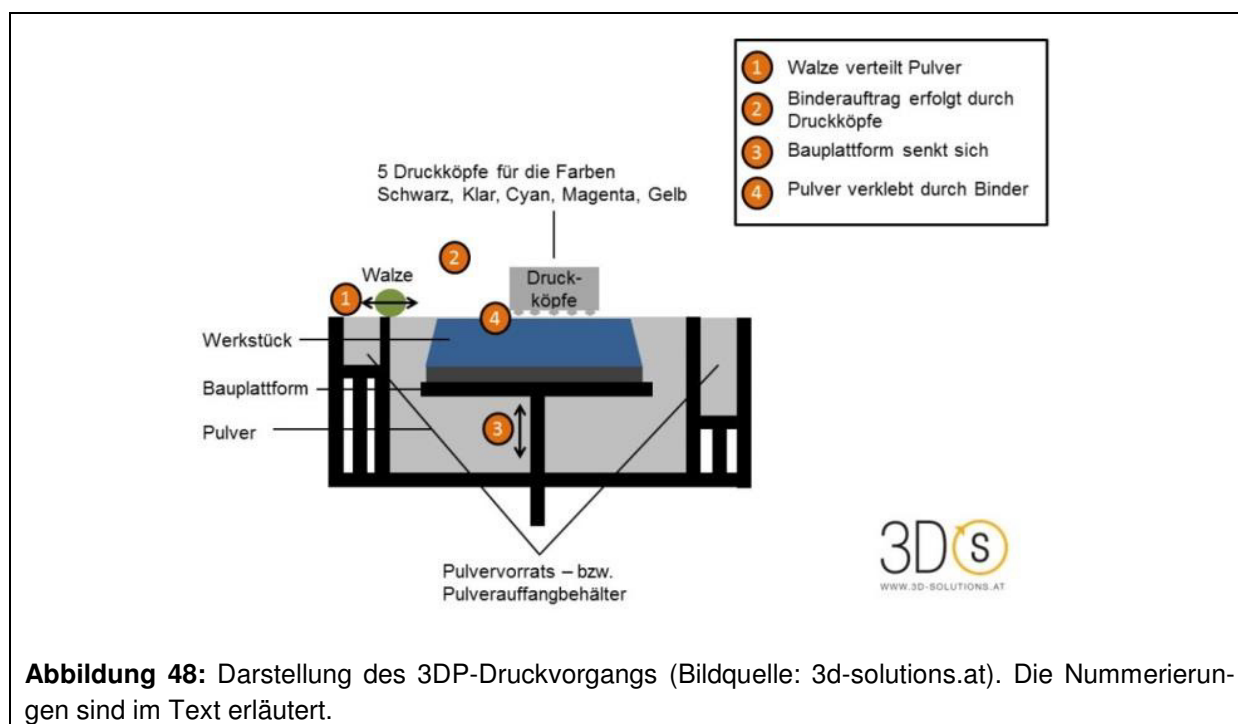


Abbildung 48: Darstellung des 3DP-Druckvorgangs (Bildquelle: 3d-solutions.at). Die Nummerierungen sind im Text erläutert.

4.1.4.2 Fused Deposit Modelling (FDM)

Beim FDM-Verfahren wird ein Kunststoff, zumeist Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS), erhitzt, bis das erzielte Fließverhalten ein Pressen durch eine Druckdüse erlaubt. Der flüssige Kunststofffaden wird zum Aufbau des 3D-Bauteils genutzt. In den meisten Fällen ist es not-

wendig mit Hilfe eines zweiten Kunststoffes Stützstrukturen aufzubauen, die im Nachhinein entfernt werden müssen. Da die Druckstruktur des Fadens im 3D-Bauteil deutlich zu erkennen ist, eignet sich dieses Verfahren eher im Modellbau.

4.1.4.3 Selektives Lasersintern (SLS)

Mit Hilfe des Selektiven Lasersintern ist ein Übergang vom *Rapid Prototyping*, d.h. dem Erstellen von 3D-Modellen, zum *Rapid Manufacturing*, d.h. der Fertigung real einsetzbarer Bauteile, möglich. Die verarbeiteten Kunststoffe, wie Polyamide, Elastomere, Nylon oder Alumide, zeichnen sich durch eine hohe mechanische Stabilität, Biokompatibilität, hohe Verarbeitungspräzision und geringe Materialkosten aus. Das SLS-Fertigungsverfahren nutzt ebenfalls pulverförmiges Ausgangsmaterial, das unter erhöhtem Druck auf der Trägerplattform erhitzt wird (Abbildung 49). Das lokale Sintern der einzelnen Materialschichten geschieht durch einen fokussierten Laserstrahl, vorwiegend CO₂-Laser oder Nd:YAG-Laser. Auch im SLS-Verfahren wird die Trägerplattform schichtweise abgesenkt und abschließend nicht verschmolzenes Pulver entfernt.

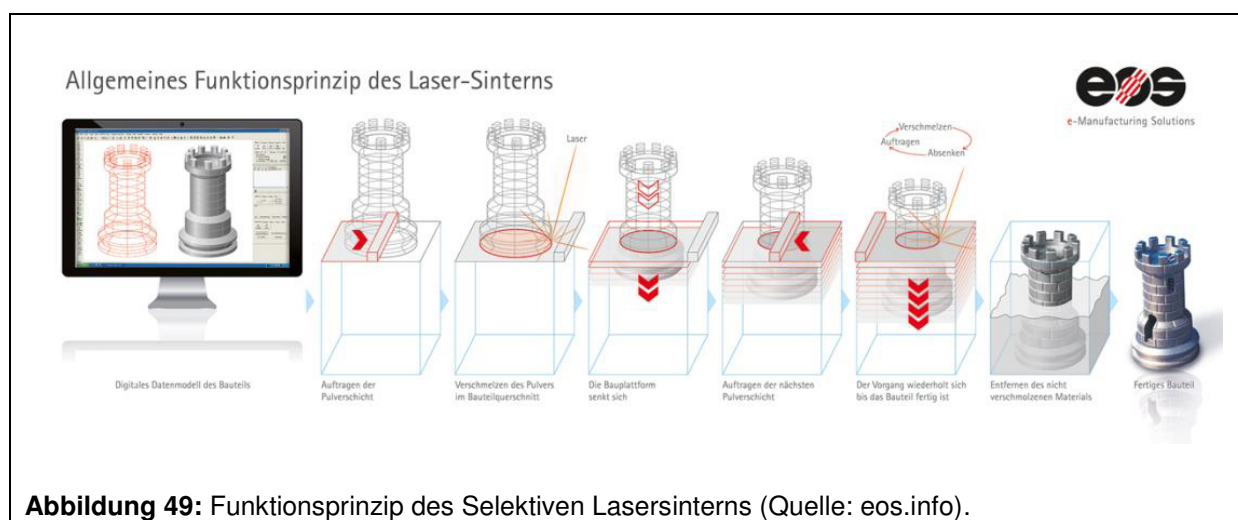


Abbildung 49: Funktionsprinzip des Selektiven Lasersinterns (Quelle: eos.info).

4.1.4.4 Selektives Laserschmelzen (SLM)

Beim Selektiven Laserschmelzen wird das metallische Pulvermaterial, u.a. Werkzeugstahl, Edelstahl, Titan oder Aluminium, nicht gesintert sondern direkt durch den verwendeten Laser aufgeschmolzen. Um Korrosionsvorgänge zu verhindern, wird das SLM-Verfahren in einer Schutzatmosphäre durchgeführt. Sowohl die metallischen Ausgangsstoffe als auch die Anforderungen während des Herstellungsprozesses bedingen die vergleichsweise hohen Herstellungskosten von individuell gefertigten Bauteilen. Nichtsdestotrotz ermöglicht das SLM-Verfahren die Herstellung sehr komplexer, porenfreier und sterilisierbarer Bauteile, die gute Wärmeleiteigenschaften bei sehr guten mechanischen Eigenschaften aufweisen.

4.1.4.5 Stereolithografie (SLA-Verfahren)

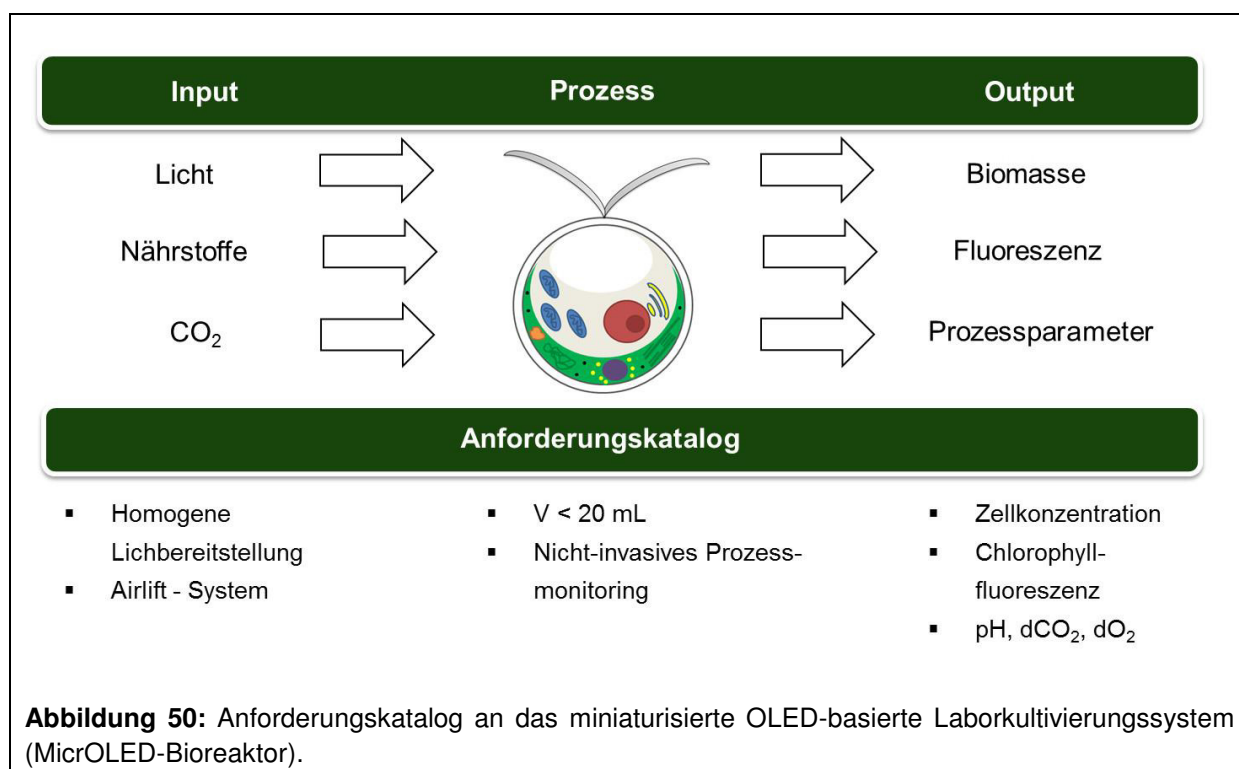
Die Stereolithografie ist zurzeit das „3D-Druck-Verfahren“ mit dem höchsten Auflösungsvermögen (bis in den μm -Bereich). Das ebenfalls als SLA abgekürzte Fertigungsverfahren nutzt UV-aushärtende Photopolymere, z.B. Elastomere, Epoxidharze oder Acrylate. Der flüssig vorliegende Ausgangsstoff wird in einer Wanne mit absenkbarer Trägerplatte platziert. Das lokale Aushärten der Kunststoffmonomere erfolgt durch einen UV-Laser. Die Trägerplatte wird abgesenkt und das Bauteil wie bei vorangegangenen 3D-Druck-Verfahren schichtweise aufgebaut. Durch die flüssig vorliegenden Monomere sind zusätzliche Stützstrukturen notwendig, die das Bauteil in der Wanne fixieren, jedoch am Ende des Fertigungsprozesses entfernt werden müssen. Die mit Hilfe des SLA-Verfahrens gefertigten Bauteile zeichnen sich sowohl durch eine hohe Detailgenauigkeit als auch gute mechanische Eigenschaften aus. Zudem ermöglicht das SLA-Verfahren die Herstellung transparenter Bauteile.

4.1.4.6 Polygrafie

Die Polygrafie vereint die Herstellungseigenschaften des klassischen 3DP-Verfahrens mit den positiven Eigenschaften der Photopolymere. Durch die Nutzung von Tintenstrahldruckköpfen muss das UV-aushärtende Material zunächst in viskoser Form vorliegen, um den Druckprozess durchführen zu können. Dies bietet die Möglichkeit verschiedene Materialien zeitgleich zu verarbeiten. Neben dem Druckmaterial kann ein weiterer Druckkopf zur Herstellung von Stützstrukturen aus einem anderen Material genutzt werden, wodurch sich Überhänge am Bauteil realisieren lassen. Die Aushärtung des Druckmaterials erfolgt in der Regel direkt nach dem Druckvorgang durch die Belichtung mit einem UV-Laser. Die genutzten Kunstharze (z.B. VeroClear) zeichnen sich ebenfalls durch eine hohe Detailgenauigkeit und robuste mechanische Eigenschaften aus. Durch zusätzliche Nachbehandlungsschritte, z.B. Lackieren oder Polieren, können weitere nutzbare Materialeigenschaften erzielt werden.

4.1.5 Zielstellung - Entwicklung eines miniaturisierten OLED-basierten Laborkultivierungssystems mit nichtinvasiven optischen Prozessmonitoring

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Evaluierung eines miniaturisierten Laborkultivierungssystems für phototrophe Mikroorganismen (MicroLED-Bioreaktor). Im MicroLED-Bioreaktor sollen die innovativen Technologien der additiven Fertigungsverfahren und der OLED-Lichttechnologie zu einem neuartigen Bioreaktorkonzept vereint werden. Der MicroLED-Bioreaktor wird als miniaturisierter Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) mit einem Arbeitsvolumen von max. 20 mL ausgeführt, um eine ausreichende Versorgung der phototrophen Zellen mit CO₂ als Kohlenstoffquelle zu gewährleisten und einen hohen Parallelisierungsgrad zu ermöglichen. Um eine aussagekräftige Bioprozessentwicklung in diesem Maßstab durchführen zu können, wird ein umfangreiches nichtinvasives optisches Prozessmonitoring hinsichtlich zellspezifischer (Zellkonzentration und Fluoreszenzsignale) Parameter und Prozessparameter der Flüssigphase (pH, dO₂ und dCO₂) vorgesehen und evaluiert.



4.2 Material und Methoden

4.2.1 Mikroorganismus, Medium und Vorkultur

Chlamydomonas reinhardtii 11.32b wurde in Form einer Schrägagarkultur von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen bezogen. Die Grünalge *C. reinhardtii* gilt als Modellorganismus und wurde von der Deutschen Botanischen Gesellschaft zur Alge des Jahres 2014 gekürt. Die einzellige haploide Mikroalge ist in der Lage in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen sexuelle oder asexuelle Vermehrung durchzuführen. *Chlamydomonas* verfügt über ein Flagellum, das von einem photosensitiven Augenfleck gesteuert (siehe Abbildung 51) wird und die Algenzelle zur Phototaxis befähigt. Der Metabolismus kann sowohl autotroph mit CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle, als auch heterotroph durch die Verstoffwechslung organischer Kohlenstoffquellen erfolgen.

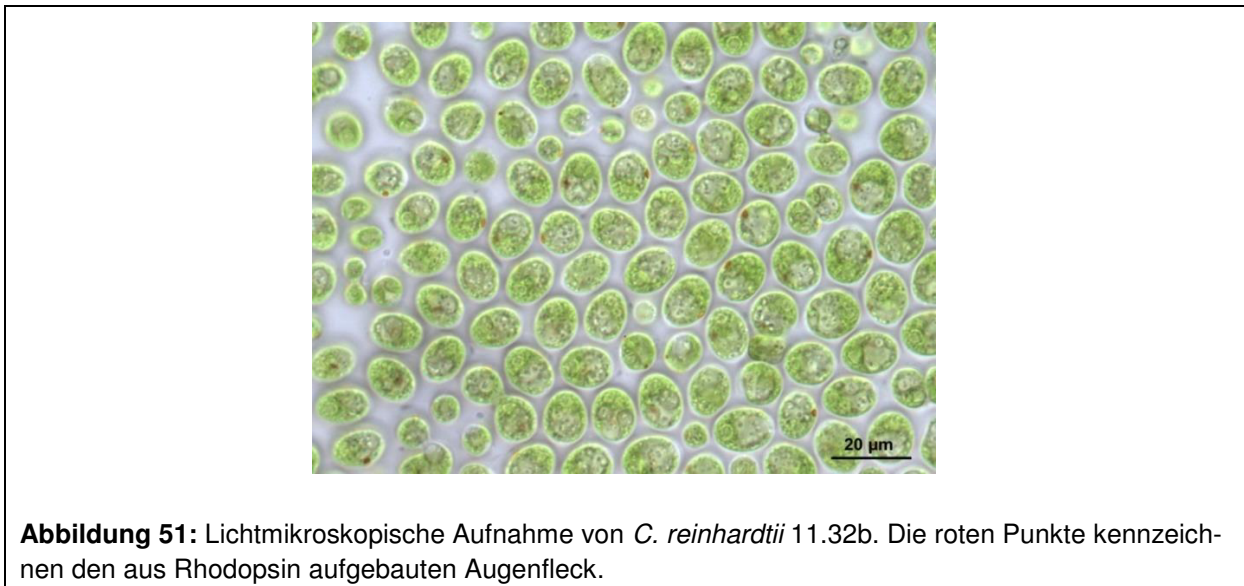


Abbildung 51: Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. reinhardtii* 11.32b. Die roten Punkte kennzeichnen den aus Rhodopsin aufgebauten Augenfleck.

Die Anzucht von *C. reinhardtii* 11.32b erfolgt durch die Inokulation von 50 mL flüssigem Tris-Acetat-Phosphat (TAP)-Medium oder High Salt (HS)-Medium in 300 mL Schüttelkolben (Schott Duran, ohne Schikanen, Wertheim, Deutschland) ausgehend von TAP-Agarplatten. Die Zusammensetzung des TAP- und HS-Mediums und die Kultivierungsbedingungen wurden der frei zugänglichen Wissensplattform <http://www.chlamycollection.org> entnommen. Die Schüttelkolbenkulturen wurden für 48 h in einem Brutschrank (WB750, mytron Bio- und Solarteknik, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland) bei 26 °C, 100 rpm und 20 μmol m⁻² s⁻¹ Leuchtstoffröhrenbeleuchtung (Hell-/Dunkelzyklus von 16/8 h) inkubiert. Für die Kultivierung unter photomixotrophen Bedingungen wurde TAP-Medium verwendet, weil Acetat *C. reinhardtii* 11.32b als Kohlenstoffquelle im Medium zur Verfügung steht. Um ausschließlich photoautotrophes Wachstum von *C. reinhardtii* 11.32b zu induzieren, wurde HS-Medium genutzt.

4.2.2 Aufbau des miniaturisierten Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktors (FPA-PBR)

Der miniaturisierte Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) besteht aus drei funktionellen Einheiten: 1. Die CAD-designte FPA-Basis, die mittels Selektiven Lasersintern aus Polyamid hergestellt wurde, 2. die FPA-Kultivierungskammer aus transparentem Polymethylmethacrylate (PMMA) und 3. die elektrischen und optischen Komponenten, die für die Beleuchtung und optische online Sensorik notwendig sind.

4.2.2.1 FPA-PBR Basis

Die FPA-PBR Basis ist modular aufgebaut und besteht aus einem Fußteil, zwei OLED-Rahmen, die sowohl die OLED-Module als auch die Ansteuerungselektronik beinhalten und der Sensorikhalterung. Letztere enthält alle optischen Elemente (Anregungs-LEDs, Photodioden, optional spektrale Filter) für die Messung von zellspezifischen Parametern und deren Ansteuerungs- und Ausleseelektronik. Ein weiteres Modul ist die Halterung für die polymeroptischen Fasern (POF), die zum Auslesen der optischen Sensorspots in der FPA-Kultivierungskammer an der transparenten Reaktorwand fixiert wird. Abgeschlossen wird das FPA-PBR-System durch einen Deckel aus Polyamid, der über eine O-Ringdichtung auf die Kultivierungskammer gedrückt wird. Im Deckelteil des FPA-PBR, der innerhalb dieser Studie nur für den Satzbetrieb ausgelegt ist, sind Öffnungen für das Abgas und eine manuelle Probenahme vorgesehen. Alle FPA-PBR Komponenten wurden mittels SolidWorks 2012 entworfen und durch die online Plattform sculpteo.com mittels eines EOS Formiga P100 3D-Drucker aus Polyamid hergestellt. Der vollständige miniaturisierte FPA-PBR umfasst eine Länge von 100 mm, eine Breite von 65 mm und eine Höhe von 120 mm.

4.2.2.2 FPA-Kultivierungskammer

Die FPA-Kultivierungskammer wurde aus 2 mm dicken transparenten PMMA-Platten mit den inneren Abmaßen von 74 mm Länge, 26 mm Breite und 10 mm Dicke hergestellt. Damit entspricht die FPA-Fläche exakt der Emissionsfläche der OLED T37 Beleuchtungsmodule. Dadurch wird eine ideal homogene Flächenbeleuchtung auf der Oberfläche der FPA-Kultivierungskammer gewährleistet. Die FPA-Kultivierungskammer weist ein maximales Füllvolumen von 15 mL auf. Zur Begasung des Mediums wurde ein PMMA-Rohr (Innendurchmesser: 1 mm) im Boden der Kultivierungskammer integriert. Die Gasblasen steigen im Risser der FPA-Kultivierungskammer auf. Der Dichteunterschied im oberen Bereich des Risers ermöglicht die Zirkulation des Mediums um das eingebrachte Trennelement. Die Begasung erfolgte mit einem Gasgemisch (DASGIP MX4/4, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aus wassergesättigter Druckluftluft und variierenden Anteilen an CO₂.

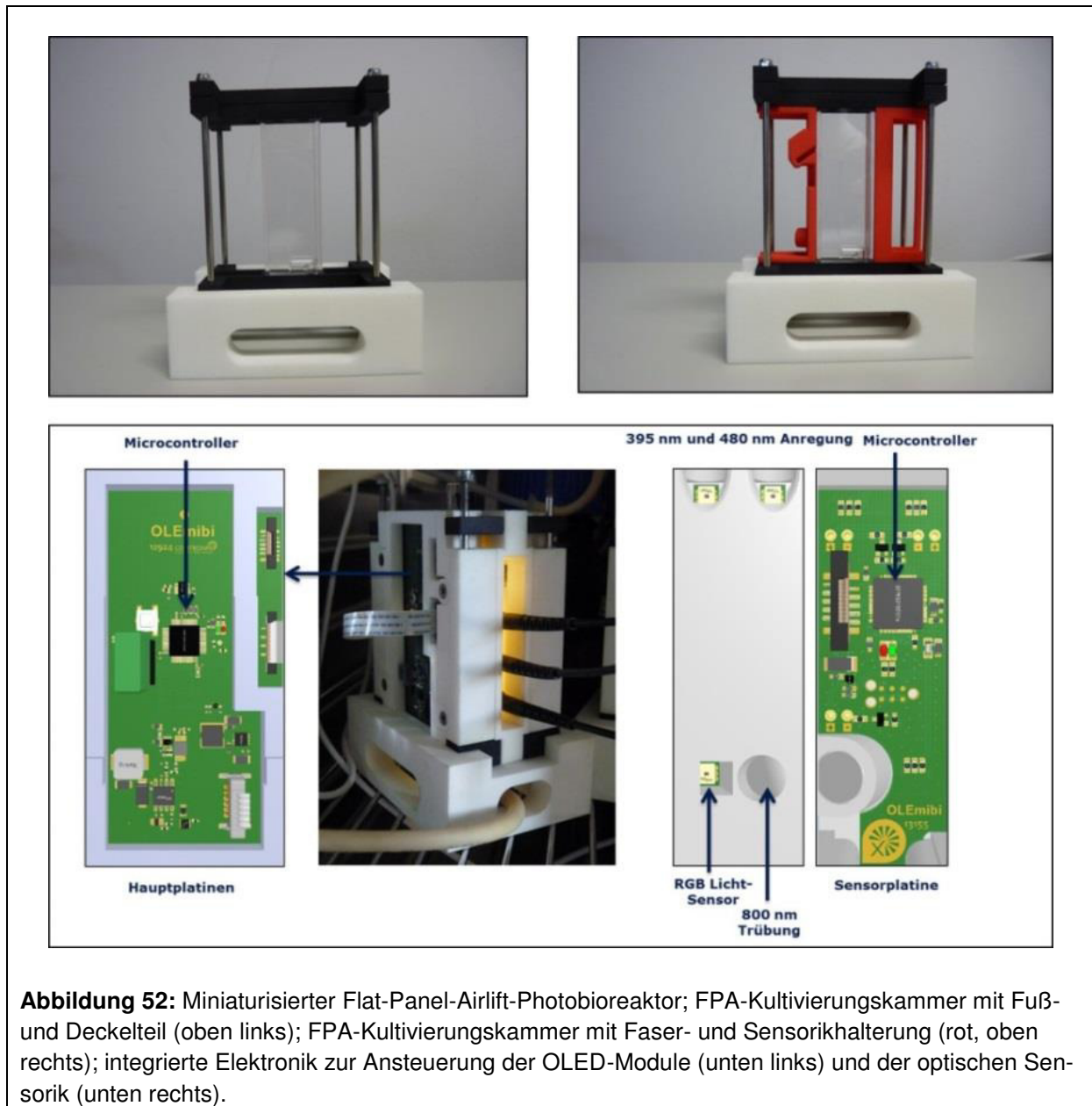


Abbildung 52: Miniaturisierter Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktor; FPA-Kultivierungskammer mit Fuß- und Deckelteil (oben links); FPA-Kultivierungskammer mit Faser- und Sensorikhalterung (rot, oben rechts); integrierte Elektronik zur Ansteuerung der OLED-Module (unten links) und der optischen Sensorik (unten rechts).

Die optische Zelldichte- und Chlorophyllfluoreszenzmessung erfolgte im Downcomer. In diesem Bereich treten keine optischen Effekte durch Blaseninterferenzen auf. Die optische nichtinvasive Bestimmung der Prozessparameter pH, dCO_2 und dO_2 , die nicht durch aufsteigende Gasblasen beeinträchtigt wird, erfolgte im Riser (Abbildung 53). Mittels ansteigender CO_2 -Anteile in der Begasung (0,1 vol% - 75 vol%) wurde experimentell validiert inwieweit die Werte der Suspensionsparameter pH und dO_2 über das Volumen der FPA-Kultivierungskammer homogen vorliegen.

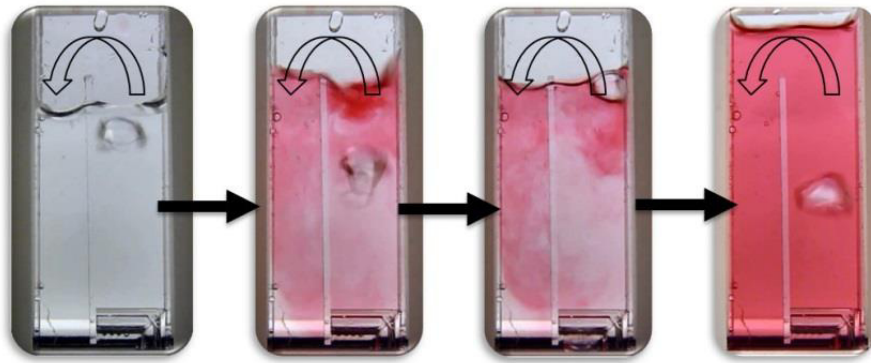


Abbildung 53: Visualisierung des internen Airlift-Prinzips in der FPA-Kultivierungskammer: Die Gasblasen steigen im Riser (rechte Seite der Kammer) auf und verursachen die Zirkulation der Flüssigphase um den Spacer. Im Downcomer (linke Seite der Kammer) treten keine Blaseninterferenzen während der optischen Messung der Zelldichte und Chlorophyllfluoreszenz auf.

4.2.2.3 OLED-Module und optische Sensoren

Die FPA-Kultivierungskammer wird an Front- und Rückseite homogen durch zwei OLED T37 Module beleuchtet, wobei der Abstand zwischen Lichtquelle und Kultivierungskammer 1 mm beträgt. Die Lichtintensität jedes OLED-Moduls wird durch einen RGB Sensor (TCS3471, TAOS, Plano, USA), der direkt vor der OLED-Lichtquelle platziert ist, in Echtzeit detektiert und durch die Prozessleitsoftware auf einen definierten Wert geregelt. Die Sensorikplatine ermöglicht die Messung von bis zu drei zellspezifischen Parametern durch die transparente PMMA-Reaktorwand. In dieser Studie wurden zwei Parameter, die Zelldichte bei 800 nm und die Chlorophyllfluoreszenz (Anregung: 480 nm; Fluoreszenzbereich: 600 - 900 nm), während der Satzkultivierung von *C. reinhardtii* 11.32b in Echtzeit detektiert.

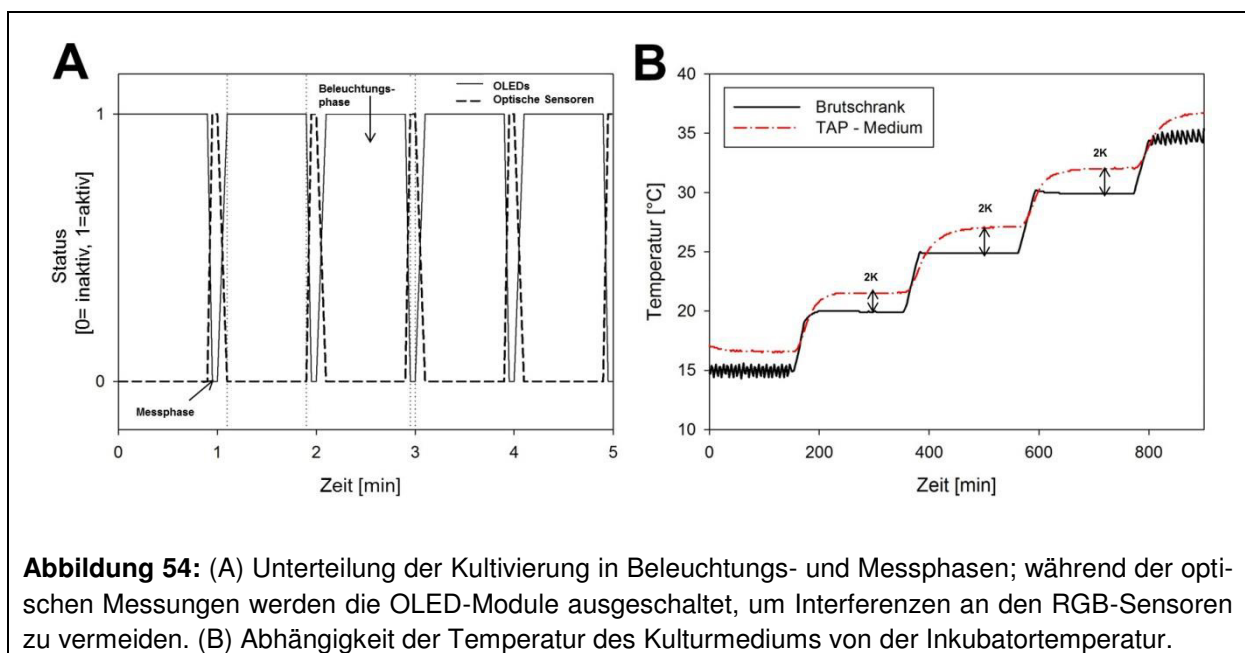


Abbildung 54: (A) Unterteilung der Kultivierung in Beleuchtungs- und Messphasen; während der optischen Messungen werden die OLED-Module ausgeschaltet, um Interferenzen an den RGB-Sensoren zu vermeiden. (B) Abhängigkeit der Temperatur des Kulturmediums von der Inkubatortemperatur.

Die Chlorophyllfluoreszenz liefert Informationen hinsichtlich der Effizienz der Photosysteme im Bioprozess. Die online gemessene Trübung der Zellsuspension bei 800 nm wurde zuvor gegen die Biotrockenmassekonzentration (BTM) im Bereich von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ - $1,2 \text{ g L}^{-1}$ kalibriert und folgende Korrelation bestimmt:

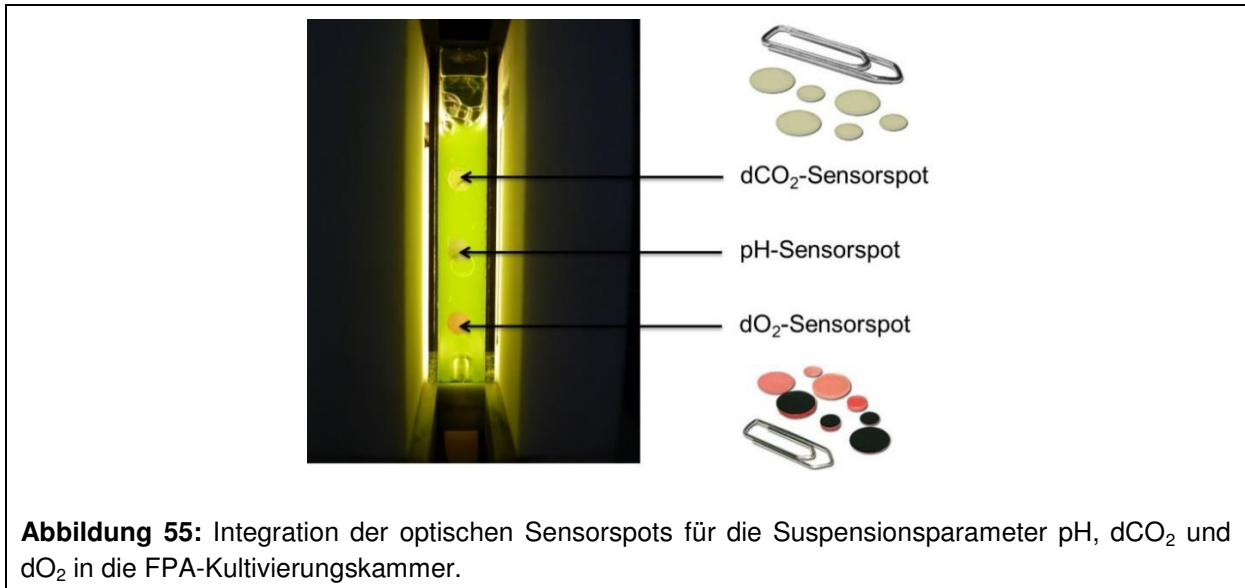
$$\ln BTM = 0,673 - (6 \cdot 10^{-4} \cdot RGB \text{ counts}) \quad (15)$$

Um einen störenden Einfluss der OLED-Beleuchtung während der Trübungs- und Fluoreszenzmessung zu umgehen, wurde der Prozess in einen Beleuchtungs- und einen Messzyklus unterteilt (Abbildung 54). Im Messzyklus werden dabei beide OLED-Module ausgeschaltet, um die optischen Messungen durchzuführen. Die nichtinvasive Detektion der Prozessparameter pH, $d\text{CO}_2$ und $d\text{O}_2$ erfolgte über optische Sensorspots (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland), die auf der Innenseite der FPA-Kultivierungskammer integriert wurden (Abbildung 55). Das Auslesen der optischen Sensoren wurde durch die transparente PMMA-Reaktorwand mittels polymeroptischer Fasern, die in der 3D-gedruckten Faserhalterung fixiert wurden, realisiert. Die Verarbeitung der optischen Signale erfolgte in den jeweiligen Transmittern für pH (ph1-mini, PreSens), $d\text{O}_2$ (Fibox 4) und $p\text{CO}_2$ ($p\text{CO}_2$ mini).

Die Messung des $d\text{O}_2$ basiert auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Quenchings. Die Fluoreszenz des in den Sensorpatches immobilisierten und angeregten Fluoreszenzfarbstoffes wird durch den Kontakt mit molekularem Sauerstoff gequencht, d.h. gelöscht. Damit ergibt sich eine direkte Abhängigkeit zwischen der Konzentration des gelösten Sauerstoffes und der Fluoreszenzintensität des immobilisierten Fluorophors. Die Messung des pH Wertes erfolgt nach identischem Prinzip, jedoch wird ein Referenzfarbstoff eingesetzt, dessen Fluoreszenzsignal als interne Kontrolle dient (*Dual-Lifetime-Referenced-Method*).

Der $p\text{CO}_2$ -Sensor gibt den Partialdruck an gelöstem CO_2 in der wässrigen Umgebung an. Gelöstes CO_2 diffundiert durch eine gaspermeable Membran und verändert den pH Wert eines intern genutzten Puffers, wodurch die Fluoreszenzeigenschaft des immobilisierten Fluorophors beeinflusst wird. Mit Hilfe eines Referenzfarbstoffes kann der CO_2 -Partialdruck gemessen werden.

Die Konzentration an gelöstem CO_2 hängt sowohl von der Temperatur als auch dem pH Wert (Kohlensäure-Gleichgewicht) der zu messenden Lösung ab. Eine Abschätzung der Gelöstkonzentration an CO_2 ist unter der Annahme konstanter Temperatur und pH Wert-Bedingungen über das Henry-Gesetz möglich.

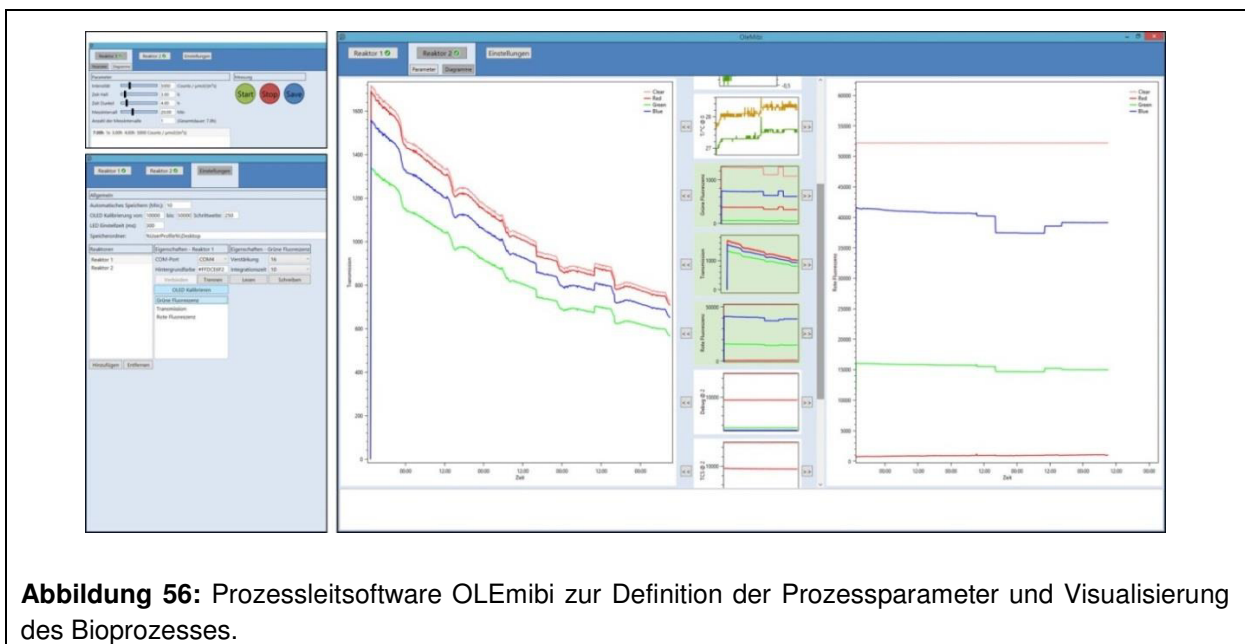


$$K_H = \frac{dCO_2}{p_{gas}} \quad (16)$$

K_H entspricht der Henry-Konstante für CO₂ (bei 25°C: 0,034 mol_{gas} L⁻¹ atm⁻¹), dCO_2 der Konzentration an gelöstem CO₂ [mol L⁻¹] und p_{gas} dem gemessenen CO₂-Partialdruck [atm].

4.2.2.4 Prozessleitsoftware OLEmibi

Die Programmierung einer Prozesssoftware, in der die Einstellung der LED-Anregungsquellen (Messzyklen), der RGB Sensoren (Signalverstärkung) und der OLED-Module (Beleuchtungszyklen, Lichtintensität) definiert wurden (Abbildung 56), erfolgte durch die Contronix GmbH. Die Kommunikation zwischen Soft- und Hardware wurde über standardisierte USB-Ports realisiert.



4.2.2.5 Sterilisation, Inokulation, Temperierung, Sensorkalibrierung und Kultivierung

Die FPA-Kultivierungskammer und der Reaktordeckel wurden in einer UV-Kammer (ELG100S, Dinies Technologies GmbH, Villingendorf, Deutschland) unter UV-A-Strahlung für 4 h sterilisiert. Eine 48 h alte Vorkultur wurde auf eine Biotrockenmassekonzentration von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ in TAP- oder HS-Medium verdünnt. 15 mL dieses Ansatzes wurden anschließend unter einer sterilen Werkbank in die FPA-Kultivierungskammer überführt und mit dem Deckel verschlossen. Die FPA-Kultivierungskammer wurde abschließend in die FPA-Basisumgebung integriert und an die Gasmischstation und die Computerkontrolleinheit angeschlossen.

Der miniaturisierte FPA-PBR wurde in einen Brutschrank platziert und bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ (Memmert, IPP400) inkubiert, um im Kulturmedium eine konstante Kultivierungstemperatur von $26 \text{ }^\circ\text{C}$ zu gewährleisten. Die 2 K Temperaturunterschied zwischen Kulturmedium und Umgebungsbedingungen resultieren aus der Wärmedissipation der OLED-Module und wurden zuvor experimentell für eine Beleuchtungsstärke von $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 54). Anschließend wurde die POF-Halterung und die Sensorikhalterung an den Längsseiten der FPA-Kultivierungskammer in das System integriert. Der pH-Wert der verwendeten Medien wurde als Referenz mit einer pH-Elektrode (pH-Meter WTW inolab pH) bestimmt und in die Kalibrierdaten der pH Sensorspots übernommen.

Während der Kultivierung von *C. reinhardtii* 11.32b wurde die Photonenflussdichte der einzelnen OLED-Module auf $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ geregelt und entweder in kontinuierlicher Form oder in Hell/Dunkel-Zyklen von 12/12 h zur Verfügung gestellt. Die volumetrische Begasungsrate wurde auf $0,5 \text{ L h}^{-1}$ (wassergesättigte Luft mit 0,1 vol%, 2,0 vol% oder 5,0 vol% CO_2) eingestellt. Die Messung der zellspezifischen Parameter und der Prozessparameter der Flüssigphase erfolgte in stündlichen Intervallen.

4.2.2.6 Bestimmung der Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] und Emissionsspektren

Die Quantifizierung der Beleuchtungsstärke wurde über ein PAR-sensitives Pyranometer (deka Sensor+Technologie, Teltow, Germany) bestimmt. Die Vermessung der Emissionsspektren der OLED-Module und der zum spektralen Vergleich herangezogenen LED-Module (Osram, Qod warm white, München, Deutschland) wurde mittels eines USB-650 Spektrometers (Ocean Optics, Florida, USA) durchgeführt. Für die Ermittlung des Lichtintensitätsprofils über den Querschnitt der FPA-Kultivierungskammer, welches direkt von den zellulären Eigenschaften von *C. reinhardtii* 11.32b abhängig ist, wurde das Lambert-Beer Gesetz laut Rorrer (2015) verwendet [18]:

$$I(z) = I_0 \cdot \exp(-(k_c BTMz)) \quad (17)$$

I_0 entspricht der Emissionsintensität der OLED-Module, welche aufgrund des geringen Abstandes zur FPA-Kultivierungskammer von 1 mm gleich der Oberflächenintensität am Reaktor gesetzt wird. $I(z)$ beschreibt die Intensität in Abhängigkeit der Weglänge z [cm] von der Lichtquelle. Der Parameter k_c [$L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$] entspricht dem zellspezifischen Abschwächungskoeffizienten, der für den zu untersuchenden Organismus jeweils experimentell für variierende BTM-Werte [$g \cdot L^{-1}$] ermittelt werden muss. Für *C. reinhardtii* 11.32b wurde k_c zu $2,284 \cdot L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ für BTM-Werte bis zu $1,0 \cdot g \cdot L^{-1}$ (bei 680 nm) mit dem Helios β UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

4.2.3 Charakterisierung der hydrodynamischen Parameter

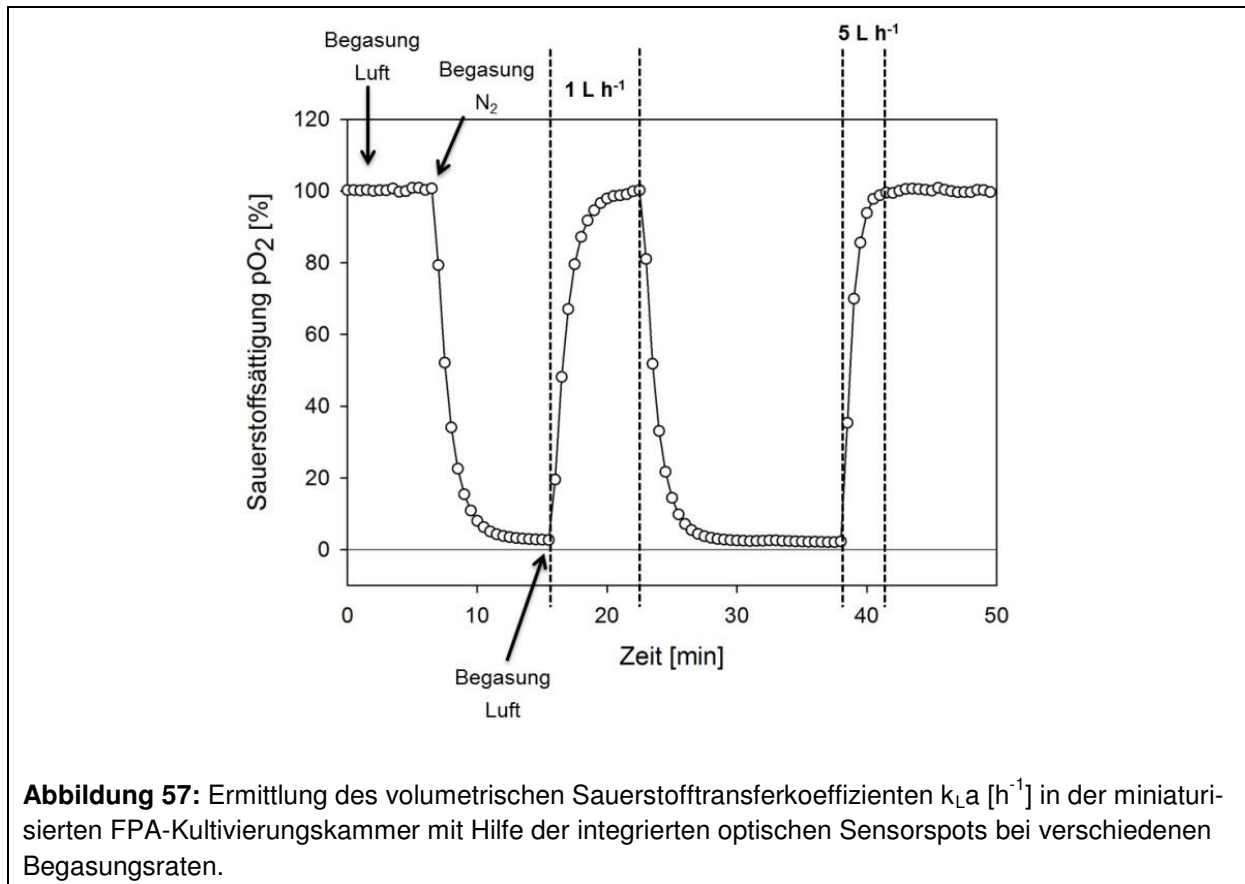
4.2.3.1 Bestimmung des volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten

$$k_L a \text{ [h}^{-1}\text{]}$$

Der volumetrische Sauerstofftransferkoeffizient $k_L a$ [h^{-1}] wurde über die dynamische Methode (Stickstoff- und Luftbegasung) für Begasungsraten im Bereich von $0,1 \cdot L \cdot h^{-1}$ bis $5,0 \cdot L \cdot h^{-1}$ ermittelt. Die Steigung der dO_2 -Konzentration ergibt sich aus:

$$\ln \frac{dO_2^* - dO_2^0}{dO_2^* - dO_2} = k_L a \cdot (t - t_0) \quad (18)$$

wobei dO_2^* der Sauerstoffsättigungskonzentration bzw. dO_2^0 und dO_2 den Sauerstoffkonzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ und zum Zeitpunkt t entsprechen. Die Messung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde über die integrierten optischen Sensorspots (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) realisiert (Abbildung 57).



4.2.3.2 Bestimmung des Gas hold-up ϵ_G , der Mischzeit t_m und der Verdunstungsverluste

Der Gas hold-up ϵ_G in der FPA-Kultivierungskammer wurde über die volumetrische Expansionsmethode nach Chisti (2009) bestimmt [76]:

$$\epsilon_G = \frac{H_T - H_L}{H_T} \quad (19)$$

H_L und H_T repräsentieren die Füllhöhen der FPA-Kultivierungskammer unter unbegasteten (nur Flüssigphase) und begasteten (Flüssig- und Gasphase) Bedingungen. Die Mischzeit t_m [s] wurde durch die Injektion einer konzentrierten Farblösung in die begastete FPA-Kultivierungskammer bestimmt. Mittels Fiji-Bildanalyse wurde die Zeit bestimmt, die zum Erreichen eines Homogenitätsgrades von 95 % erforderlich war.

Bedingt durch die aktive Begasung der Flüssigphase traten signifikante Verdunstungseffekte auf. Der prozentuale Anteil an verdunsteter Flüssigkeit wurde für die ersten 24 h bei 26 °C und variierende Begasungsraten zwischen 0,1 L h^{-1} und 5,0 L h^{-1} quantifiziert.

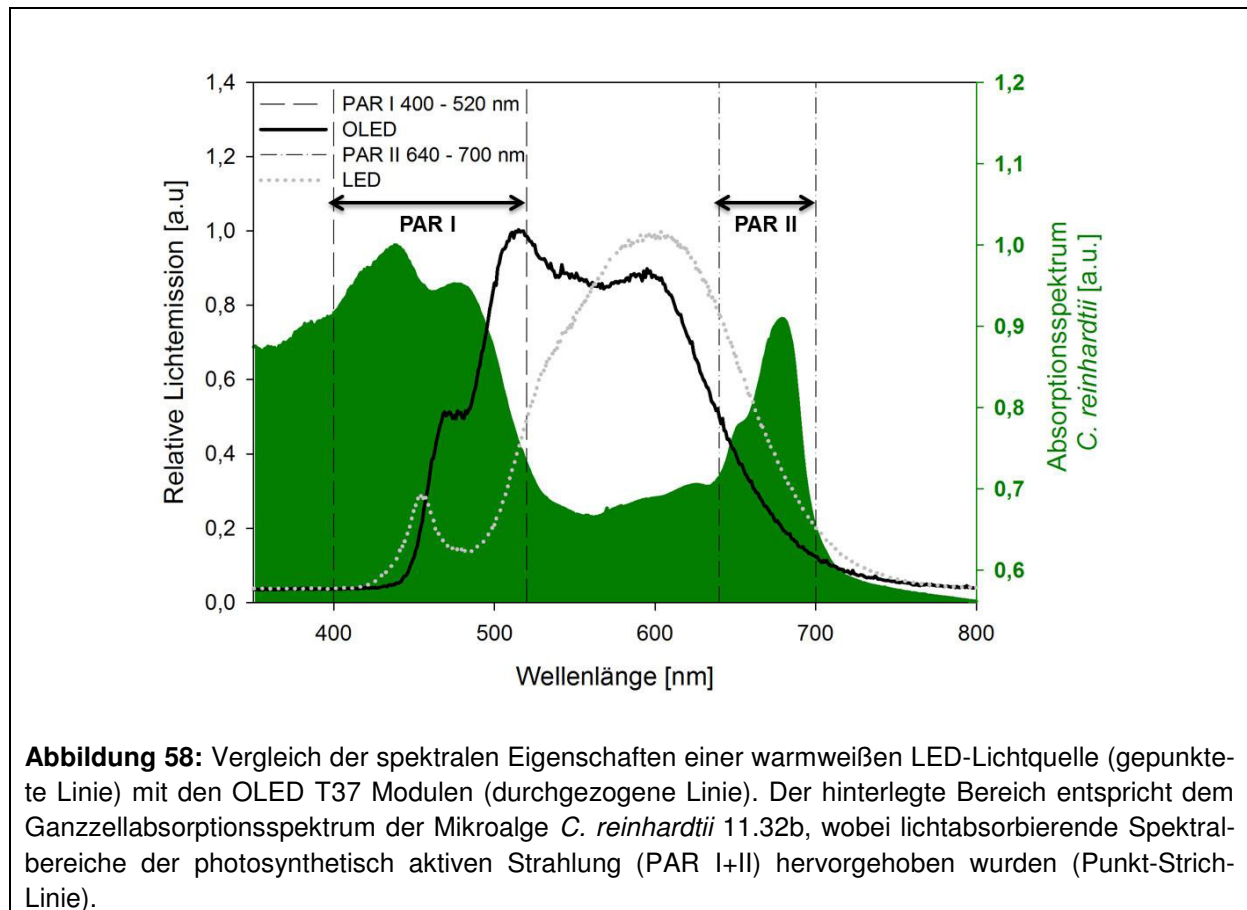
4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Vergleich der spektralen Eigenschaften von OLED und LED

Wie einleitend beschrieben, ist die Lichtquelle in Photobioreaktoren für die Bereitstellung der PAR-Strahlung zwischen 400 nm und 700 nm verantwortlich. In einem aktuellen Übersichtsartikel zeigten Schulze et al. (2015) die Vorteile von LEDs vor allem in Hinblick auf die schmalbandigen Emissionsspektren, die für die gezielte Anregung der lichtsammelnden Pigmente in phototrophen Mikroorganismen genutzt werden können [142].

In der vorliegenden Studie wurden erstmals organische lichtemittierende Dioden (OLEDs) hinsichtlich ihrer spektralen Eignung für den Einsatz in Photobioreaktoren charakterisiert. Die spektralen Anforderungen der Lichtquelle für die Kultivierung von *C. reinhardtii* 11.32b wurde durch die Aufnahme eines Ganzzellabsorptionsspektrums im Wellenlängenbereich zwischen 350 nm und 800 nm ermittelt (Abbildung 58). Daraus erfolgte die Identifizierung von zwei Absorptionsbereichen, die nachfolgend als PAR I und PAR II bezeichnet werden.

PAR I spiegelt die Absorption intrazellulärer Carotinoide und Chlorophyll b zwischen 400 nm und 520 nm wieder, wohingegen der PAR II Absorptionsbereich (640 nm - 700 nm) durch die Absorption des Hauptpigmentes Chlorophyll a hervorgerufen wird.



Der prozentuale Anteil der PAR-Emission wurde sowohl für die in dieser Studie verwendeten OLED-Module als auch für eine konventionelle warmweiße LED bestimmt und in Abbildung 58 dem Ganzzellabsorptionspektrum von *C. reinhardtii* 11.32b überlagert. Beide Lichtquellen emittieren Photonen im Wellenlängenbereich von 410 nm - 800 nm. Die prozentualen Anteile der Lichtemitter im PAR I- und PAR II-Absorptionsbereich sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Emission des OLED-Moduls zeigte eine Emission von 26,12 % im PAR I Bereich, was nahezu dem doppelten Anteil im Vergleich zur LED-Lichtquelle entspricht (13,41 %). Im Gegenzug wurde die Emission der LED im PAR II Bereich zu 18,27 % bestimmt. Die OLED-Module emittierten in diesem Bereich lediglich 9,19 % ihrer Gesamtstrahlung.

Die kumulative PAR-Effizienz ergab für die warmweiße LED 31,68 % und für die OLED-Module 35,31 %. Diese Effizienz könnte durch die Nutzung von schmalbandigen Emittlern im PAR I und PAR II Bereich signifikant verbessert werden. Jahnel et al. (2015) zeigten, dass durch die Integration optischer Elemente die spektralen Eigenschaften von top-emittierenden OLED-Modulen gezielt beeinflusst werden können [150].

Tabelle 7: Vergleich des prozentualen Anteils an photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) von LED und OLED-Lichtquelle.

Lichtquelle	PAR I (400 nm - 520 nm)	PAR II (640 nm - 700 nm)	Totale PAR- Effizienz
Warm-weiße LED	13,41 %	18,27 %	31,68 %
Weißer OLED	26,12 %	9,19 %	35,31 %

Im spektralen Vergleich mit der konventionell genutzten und dem Stand der Technik entsprechenden warmweißen LED-Lichtquelle zeigten die OLED-Module eine vergleichbare qualitative Lichtemission im PAR-Strahlungsbereich. Die OLED-Lichttechnologie ist von den spektralen Voraussetzungen somit gut für den Einsatz in Photobioreaktoren geeignet.

4.3.2 Bestimmung der OLED-Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

Die geringen erzielbaren Beleuchtungsstärken auf Basis der Elektrolumineszenz waren bisher der limitierende Faktor für den Einsatz von OLEDs in der Photobioreaktortechnik. Aus diesem Grund ist neben den spektralen Eigenschaften der organischen Emitter, die Ermittlung der PFD für die genutzten OLED-Module essentiell. Die angelegte Spannung wurde im Bereich von 0 - 10 V variiert und die resultierende PFD bestimmt (Abbildung 59).

In Abbildung 59 ist die PFD in Abhängigkeit der angelegten Spannung für ein OLED-Modul dargestellt. Die maximale gemittelte PFD von $83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde bei einer Spannung von 10 V erreicht. Anhand der aufgenommenen Kennlinie wird deutlich, dass die PFD sehr präzi-

se über die Spannung geregelt werden kann. Im Bereich geringer Spannungen sind die Abweichungen zwischen einzelnen OLED-Modulen vernachlässigbar, wohingegen bei höheren Spannungen Abweichungen von bis zu 6,7 % auftreten.

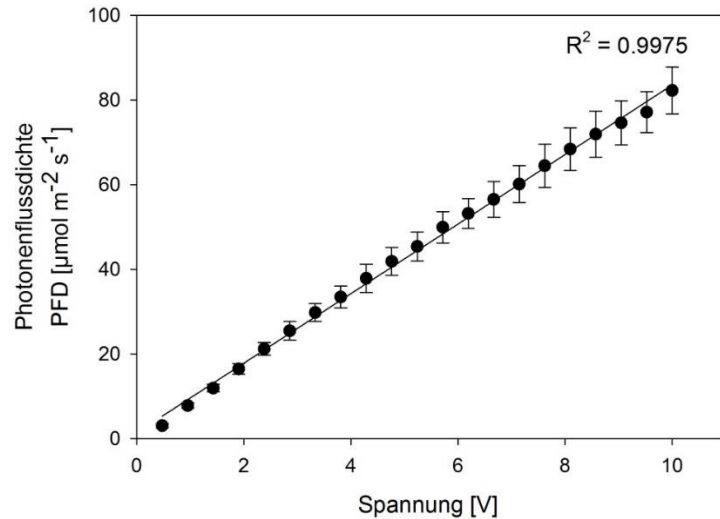


Abbildung 59: Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] der OLED T37 Module in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

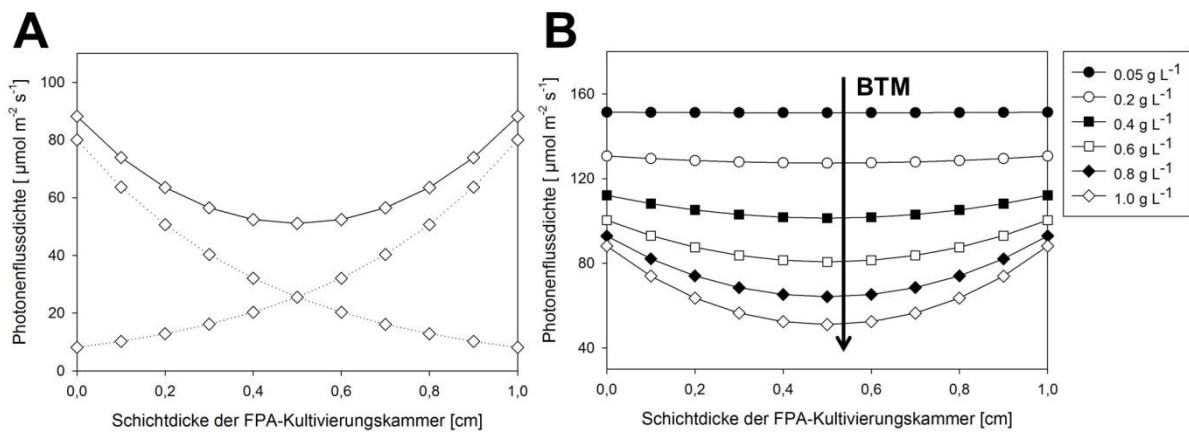


Abbildung 60: Simulierte Profile der Photonenflussdichte PFD über den Querschnitt der FPA-Kultivierungskammer bei (A) einseitiger Beleuchtung (gepunktete Linie, $I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, BTM = $1,0 \text{ g L}^{-1}$) und zweiseitiger Beleuchtung (durchgezogene Linie, $I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, BTM = $1,0 \text{ g L}^{-1}$) bzw. (B) zweiseitiger Beleuchtung ($I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und variierenden BTM ($0,05 \text{ g L}^{-1} - 1,0 \text{ g L}^{-1}$).

Abbildung 60A zeigt vergleichend die PFD-Profile, die über den Querschnitt der FPA-Kultivierungskammer bei ein- bzw. zweiseitiger Beleuchtung ($I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, BTM = $1,0 \text{ g L}^{-1}$) erzielt werden. Während die Intensität bei einseitiger Beleuchtung durch die verstärkte Selbstabschattung mit steigender Weglänge exponentiell abnimmt, wird durch eine zweiseitige Beleuchtung und die kumulierenden Intensitäten ein parabolisches PFD-Profil erzielt.

Dies ermöglicht eine homogene Bereitstellung der PAR-Strahlung über den Querschnitt der FPA-Kultivierungskammer.

In Abbildung 60B sind die PFD-Profile bei konstantem I_0 von $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit der Algenbiotrockenmasse dargestellt. Die BTM zu Beginn der Kultivierung wurde stets auf $0,05 \text{ g L}^{-1}$ eingestellt. Bei dieser geringen Zellkonzentration wird ein sehr homogenes PFD-Profil bei $151 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestellt. Steigt die BTM in der FPA-Kultivierungskammer im Verlauf der Kultivierung bis auf $1,0 \text{ g L}^{-1}$ an, bildet sich ein parabolisches PFD-Profil aus und die verfügbare PAR-Intensität in der Kultivierungskammer nimmt ab.

Konventionelle LED-Lichtquellen erzielen PFD-Intensitäten von bis zu $2.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die einzelnen OLED-Module des miniaturisierten FPA-PBRs erreichen nur ca. 4 % dieser PFD-Leistung. Durch das Konzept der zweiseitigen Beleuchtung und der passiven Temperierung können bei geringen Zellkonzentrationen auch in dem FPA-PBR PFD-Intensitäten von bis zu $151 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ generiert werden. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das Optimum der photosynthetische Effizienz von Mikroalgen im Bereich von $150 - 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegt [138, 151]. Bei steigenden PFD-Werten tritt zuerst ein Sättigungsbereich ein, bevor zu hohe Intensitäten zu Effekten der Photoinhibition führen. Der OLED-basierte FPA-PBR ist damit in der Lage, die PFD in physiologisch günstigen Intensitäten zur Verfügung zu stellen. Zudem ergeben sich weitere Vorteile für die Kultivierung von Mikroalgen mit OLED-Lichtquellen. Zum einen wird die PAR-Strahlung den phototrophen Organismen ideal homogen bereitgestellt, wodurch zyklische Beleuchtungsschwankungen durch heterogene Intensitätsverteilungen auf der Reaktoroberfläche minimiert werden. Darüber hinaus ermöglichen die OLED-Module eine präzise und reproduzierbare Einstellung der PFD bei geringen Intensitäten. Dies lässt eine sehr genaue Analyse lichtabhängiger Bioprozesse in diesem Kultivierungssystem zu.

4.3.3 Hydrodynamische Charakterisierung der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer

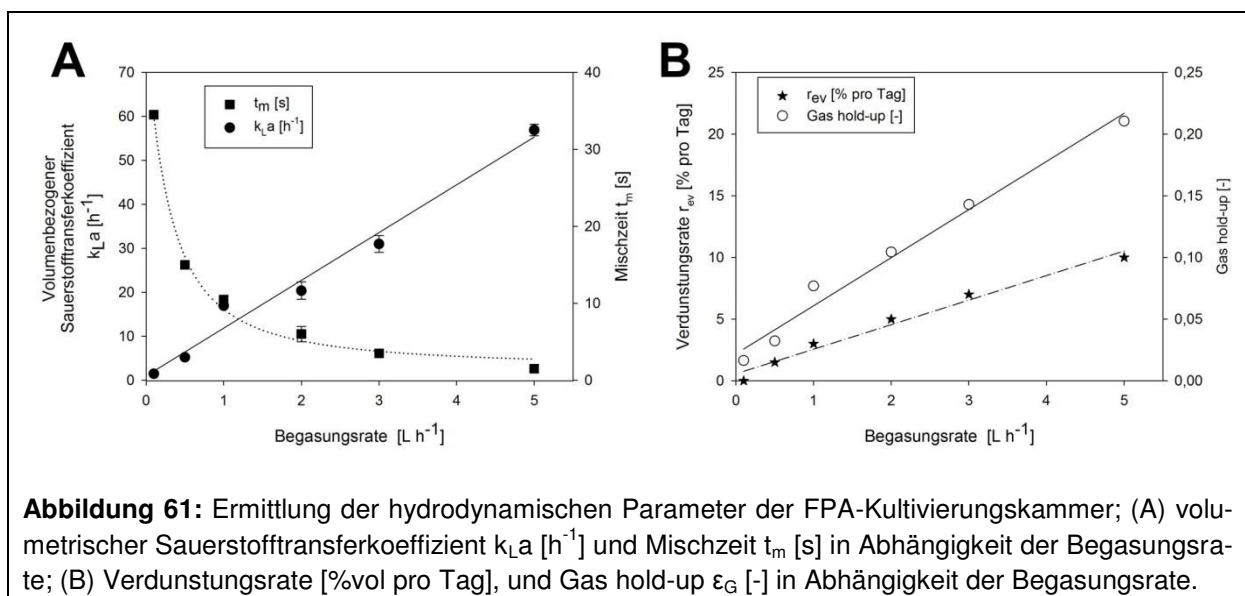
Die hydrodynamischen Parameter von Photobioreaktoren sind entscheidend für eine Vielzahl von Prozessen. Dazu zählt die neben der Versorgung der phototrophen Zellen mit Kohlenstoffdioxid ebenso die Entfernung des photosynthetisch generierten Sauerstoffes aus der Flüssigphase (Stripping), um inhibierende Übersättigung des Kulturmediums zu verhindern. Der mechanische oder pneumatische Leistungseintrag in die Flüssigphase begünstigt zudem das thermische Management, wirkt einem Sedimentieren der Zellen entgegen und initiiert eine gerichtete Bewegung der Zellen durch die unterschiedlichen Lichtzonen des Photobioreaktorvolumens. Das Verständnis der Hydrodynamik kann außerdem als Ansatzpunkt für die Übertragung von Bioprozessen in größere Maßstäbe herangezogen werden.

Das Füllvolumen der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer (0,015 L) erlaubt eine maximale volumetrische Begasungsrate von 5,0 L h⁻¹. Höhere Begasungsraten führen durch den zunehmenden Gas hold-up zum Überschwappen des Kulturmediums. Der Begasungsquerschnitt (Riser) ergibt sich anhand der FPA-Geometrie zu 0,00012 m², wodurch sich für Volumenströme von 0,1 L h⁻¹ - 5,0 L h⁻¹ Gasleerrohrgeschwindigkeiten von 0,8 m h⁻¹ 42 m h⁻¹ ergeben (Tabelle 8).

Die Mischzeit t_m [s] zeigte eine exponentielle Abnahme mit steigenden Begasungsraten von 0,1 - 5,0 L h⁻¹ (Abbildung 61A). Folgender empirischer Zusammenhang konnte für die Abhängigkeit der Mischzeit t_m [s] von der Begasungsrate [L h⁻¹] bestimmt werden:

$$t_m = 1,42 \cdot e^{\left(\frac{4,08}{\text{Begasungsrate}+1,18}\right)} \quad (20)$$

Aufgrund des geringen Arbeitsvolumens in miniaturisierten Bioreaktoren zählt die Verdunstungsrate zu einem der wichtigsten hydrodynamischen Parameter. Die Rate an verdunsteter Flüssigkeit wurde für einen Zeitraum von 24 h in Abhängigkeit der Begasungsraten evaluiert.



Im Bereich von 0,1 L h⁻¹ - 1,0 L h⁻¹ wurden Verdunstungsraten zwischen 0,1 % und 4 % innerhalb von 24 h bestimmt (Abbildung 61B). Diese Begasungsraten sind damit für Kultivierungen im Satzbetrieb geeignet (typische Prozessdauer ca. 7 Tage) und können ohne weitere Maßnahmen hinsichtlich des Verdunstungseffektes angewendet werden. Ist es erforderlich, eine Begasungsrate von über 1,0 L h⁻¹ zu nutzen, um beispielsweise den Stoffübergang zu steigern, sind Maßnahmen zur Verringerung der Verdunstungsrate erforderlich. Dies könnte u.a. über eine Prozessführung im Zulauf- oder Chemostatverfahren realisiert werden, wodurch Verdunstungsverluste durch den Feed ausgeglichen werden. Alternativ muss der

verdunstete Flüssigkeitsanteil durch die regelmäßige Zugabe von sterilem Wasser ausgeglichen werden.

Der Gas hold-up ε_G [-] und der volumetrische Sauerstofftransportkoeffizient k_{La} [h^{-1}] zeigten eine lineare Abhängigkeit bei steigenden Begasungsraten. Im Bereich von $0,1 \text{ L h}^{-1}$ - $1,0 \text{ L h}^{-1}$ wurden für ε Werte von $0,016$ - $0,077$ und für den k_{La} von $1,5$ - 17 h^{-1} ermittelt. Durch eine weitere Steigerung der Begasungsrate auf $5,0 \text{ L h}^{-1}$ wurden Werte von $0,21$ für ε_G und ein k_{La} von $56,9 \text{ h}^{-1}$ bestimmt.

Tabelle 8 gibt einen vergleichenden Überblick über die hydrodynamischen Eigenschaften verschiedener Maßstäbe an FPA-PBRs. Reyna-Velarde et al. (2010) führten ebenfalls hydrodynamische Untersuchungen für einen FPA-PBR mit 50 L Arbeitsvolumen durch [152]. Dies entspricht einem Volumenfaktor von 3333 im Vergleich zu dem hier vorgestellten miniaturisierten FPA-PBR. Die Autoren kultivierten *Spirulina* ssp. bei einer Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G von $30,2 \text{ m h}^{-1}$, welche in einem Gas hold-up ε_G von $0,033$ und einen k_{La} Wert von $20,3 \text{ h}^{-1}$ resultierte. Bedingt durch geometrische Unterschiede im Riser und Sparger der beiden Maßstäbe an FPA-PBRs unterschieden sich u_G ($8,3 \text{ m h}^{-1}$ vs. $30,2 \text{ m h}^{-1}$) und die Mischzeit t_m ($10,5 \text{ s}$ vs. 44 s) um den Faktor 4 . Nichtsdestotrotz ist es möglich, den Stofftransport in Form des k_{La} Wertes (17 h^{-1} vs. $20,3 \text{ h}^{-1}$) und den Gas hold-up ε_G ($0,077$ vs. $0,033$) in dem miniaturisierten FPA-PBR abzubilden. Vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften wurden ebenfalls von einem 250 L FPA-PBR berichtet [153]. Die Zunahme des Arbeitsvolumens führte allerdings zu einer erheblichen Zunahme der Mischzeit t_m . Die hydrodynamischen Parameter ε_G ($0,018$) und k_{La} ($25,2 \text{ h}^{-1}$) stimmen aber weitestgehend mit den ermittelten Werten für das miniaturisierte Kultivierungssystem bei einer Begasungsrate von $1,0 \text{ L h}^{-1}$ überein.

In Tabelle 8 sind zudem die hydrodynamischen Parameter weiterer FPA-PBR Konzepte mit externer [154] oder internen Schlaufe [155] dargestellt. Die externe Schlaufen-Konfiguration, die von Massart et al. (2014) vorgestellt wurde, weist eine hohe Mischzeit t_m von 312 s und einen schlechten Stofftransport, der durch einen niedrigen k_{La} von lediglich $1,08 \text{ h}^{-1}$ wieder gespiegelt wird, auf [154]. Durch die Verwendung einer internen Schlaufe im FPA-PBR System von Pirouzi et al (2014) wird sowohl die Mischzeit als auch der Stofftransport wesentlich verbessert [155].

Tabelle 8: Vergleich der hydrodynamischen Parameter verschiedener Maßstäbe von FPA-PBRs.

Art des Photobio-reaktors	Arbeitsvolumen [L]	Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G [m h ⁻¹]	Gas hold-up ϵ_G [-]	Mischzeit t_m [s]	k_{La} [h ⁻¹]	Quelle
Miniaturisierter FPA-PBR						
0,1 - 1,0 L h ^{-1*}	0,015	0,8 - 8,3	0,016 - 0,077	34,5 - 10,5	1,5 - 17	Diese Arbeit
1,0 - 5,0 L h ^{-1**}	0,015	8,3 - 42	0,077 - 0,21	10,5 - 1,5	17 - 56,9	Diese Arbeit
FPA-PBR	50	0,18 - 30,2	0,004 ^{***} - 0,033	10 - 44	0,9 - 20,3	[152]
FPA-PBR	250	27,36	0,018	100 - 200	25,2	[153]
Weitere PBR-Konzepte						
FPA-PBR mit externer Schlaufe	12,8	-	-	312	1,08	[154]
FPA-PBR mit interner Schlaufe	50	1 - 5	0,001 - 0,006	39 - 122	19 - 90	[155]

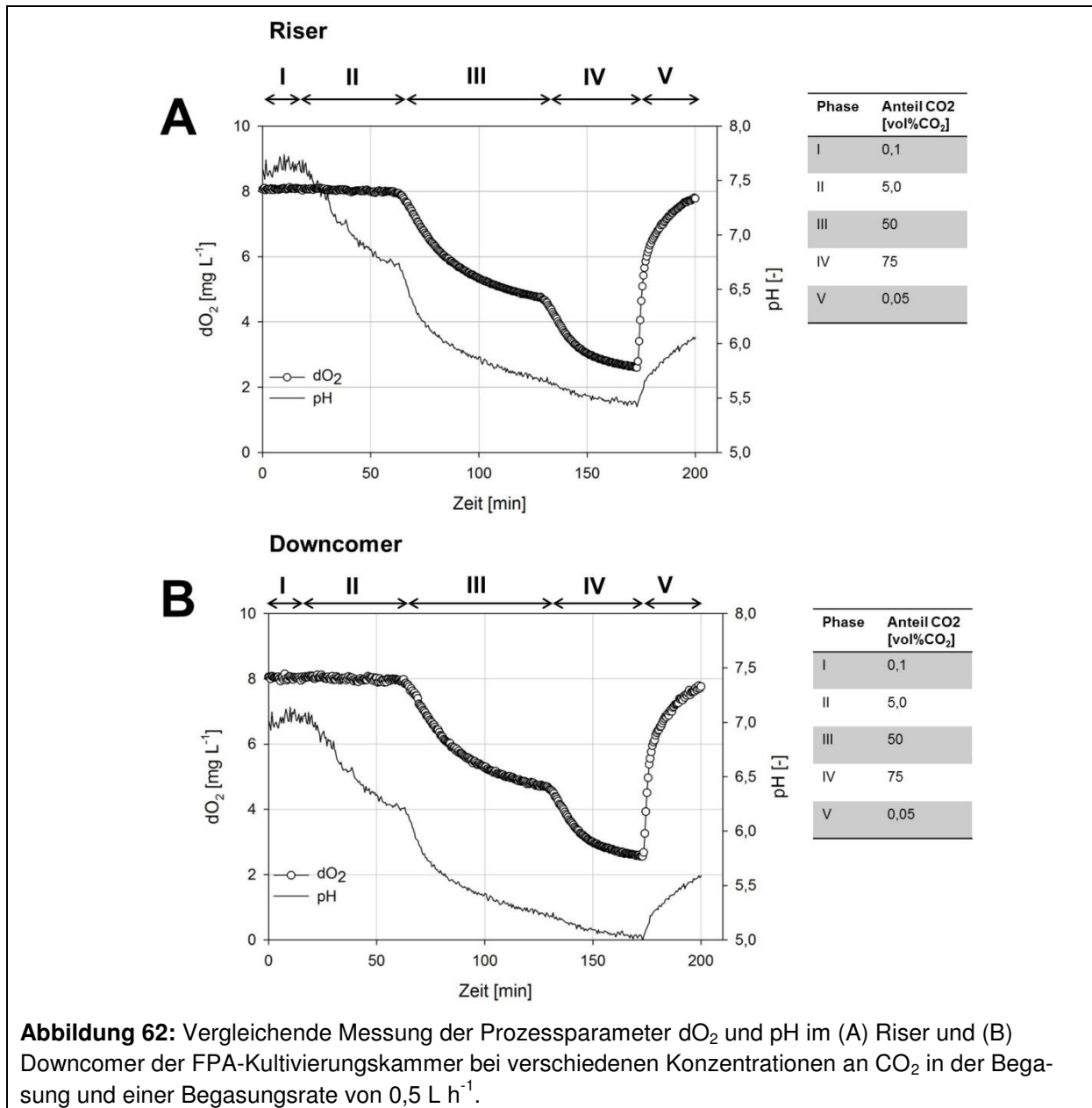
* Begasungsraten für die Kultivierung im Satzbetrieb

** Begasungsraten für die Kultivierung im kontinuierlichen Betrieb (Maßnahmen gegen hohe Verdunstungsraten notwendig)

*** Geschätzt aus Abbildung

4.3.4 Nichtinvasives optisches Prozessmonitoring der Suspensionsdynamik

Im Folgenden wurde analysiert, ob die Suspensionsparameter pH und dO_2 über das Volumen der FPA-Kultivierungskammer, d.h. sowohl im Riser als auch im Downcomer, den Algenzellen homogen zur Verfügung stehen. Dazu wurde der CO_2 -Gehalt der Begasung schrittweise von 0,1 vol% auf 75 vol% erhöht und der dO_2 sowie der pH-Wert in beiden Reaktorbereichen gemessen. Auf die Messung des gelösten Kohlenstoffdioxids wurde verzichtet, da die Henry-Konstante und damit die Löslichkeit von CO_2 eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert besitzt und die verwendeten CO_2 -Sensorspots lediglich für CO_2 -Anteile von bis zu 25 vol% einsetzbar sind.



Bei einer volumetrischen Begasungsrate von $0,5 \text{ L h}^{-1}$ und den damit verbundenen hydrodynamischen Bedingungen wurden max. 60 Minuten bis zur Einstellung konstanter Suspensionsparameter benötigt.

Der Verlauf des dO_2 im Riser und Downcomer der FPA-Kultivierungskammer stimmt für die untersuchten Prozessphasen nahezu überein. Durch die Erhöhung des CO_2 -Anteiles in der Begasung sinkt der pH-Wert der Suspension ab, wobei der Verlauf in beiden Reaktorbereichen identisch ist. Der höhere pH-Ausgangswert im Riser ist vermutlich auf abweichende Kalibrierdaten der Sensorpatches zurückzuführen.

Abbildung 62A zeigt den Verlauf des dO_2 und des pH-Wertes im Riser. In den fünf aufeinanderfolgenden Phasen wurde der CO_2 -Anteil der Zuluft bei einer Begasungsrate von $0,5 \text{ L h}^{-1}$

entsprechend der Legende variiert. Der dO_2 bleibt bis zu einem CO_2 -Anteil von 5 vol% konstant (Phase I + II), wohingegen die Erhöhung des CO_2 -Anteiles von 0,1 vol% auf 5 vol% mit einem Absinken des pH-Wertes einhergeht (Phase II). Dies wird durch den erhöhten CO_2 -Partialdruck und dem zugrundeliegenden Kohlensäure-Gleichgewicht verursacht. Dieser Effekt wird durch die weitere Erhöhung des CO_2 -Anteiles auf 50 vol% und 75 vol% in der Begasung deutlich (Phase III und Phase IV). Der hohe CO_2 -Partialdruck resultiert in einem signifikanten Abfall des pH-Wertes unter 6,0 und einer Abnahme der gelösten O_2 -Konzentration auf $4,7 \text{ mg L}^{-1}$ (50 vol% CO_2) bzw. $2,6 \text{ mg L}^{-1}$ (75 vol% CO_2).

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass bei einer Begasungsrate von $0,5 \text{ L h}^{-1}$ in beiden Bereichen der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer, d.h. Riser und Downcomer, homogene Bedingungen hinsichtlich der Suspensionsparameter pH und dO_2 erzielt werden.

4.3.5 Anwendungsbeispiel I: Monitoring der Stoffwechselaktivität von Mikroalgen

Die Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 , pH und die zellspezifischen Eigenschaften (Zellkonzentration und Chlorophyllfluoreszenz) wurden während des Wachstums der Mikroalge *C. reinhardtii* 11.32b in einem der meist verwendeten Medien zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen, dem sogenannten TAP-Medium, über die integrierten nichtinvasiven optischen Methoden analysiert. Das im TAP-Medium enthaltene Acetat stellt eine potentielle Kohlenstoffquelle für den heterotrophen Stoffwechsel von *C. reinhardtii* 11.32b dar.

Die OLED-emittierte PAR-Strahlung wurde entweder in kontinuierlicher Form oder in Hell-/Dunkelzyklen von 12/12 h zur Verfügung gestellt. Abbildung 63 stellt den zeitlichen Verlauf der zellspezifischen Parameter und Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH dar. In Abbildung 63A ist ein exponentieller Anstieg der BTM während der ersten 10 h Kultivierungsdauer unter kontinuierlicher Beleuchtung zu erkennen. Die Suspensionsparameter zeigten in diesem Zeitraum eine Zunahme des pH-Wertes von 6,6 auf 7,0, ein Absinken der dO_2 -Konzentration auf nahezu anaerobe Bedingungen bei gleichzeitigem Anstieg der CO_2 -Konzentration um den Faktor 5. Der Verlauf der Suspensionsparameter deutet damit auf eine rein heterotrophe Wachstumsphase unter Verstoffwechslung des im TAP-Medium enthaltenen Acetats hin.

Im weiteren Kultivierungsverlauf stieg die Konzentration an gelöstem O_2 auf ca. 10 mg L^{-1} bei gleichzeitiger Abnahme der CO_2 -Konzentration auf unter 2 mg L^{-1} . Dieser Verlauf der Suspensionsparameter dO_2 und dCO_2 zeigt die Änderung der metabolischen Aktivität vom heterotrophen auf einen photoautotrophen Stoffwechsel. Dieses Ergebnis wird zudem durch den Übergang von einem exponentiellen zu einem linearen BTM-Anstieg unterstützt. Im Zuge der

Stoffwechseladaption von *C. reinhardtii* 11.32b wurde ein periodisches Schwingen der Parameter dO_2 und dCO_2 in der Suspension mit einer Periodendauer von ca. 8 Stunden detektiert. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff erreichte maximal 160 % Sättigung (= 13,1 mg L⁻¹), wohingegen die über das Henry-Gesetz ermittelte Konzentration an gelöstem CO₂ im Bereich von 0 mg L⁻¹ und 2 mg L⁻¹ schwang. Bisher wurde ein solches Systemverhalten in der Literatur nicht beschrieben. Dieser Effekt kann zwei mögliche Ursachen haben. Die erste Hypothese beinhaltet einen durch das Kultivierungssystem hervorgerufenen Effekt, d.h. die Einspeisung von CO₂ in die FPA-Kultivierungskammer bei der geringen Volumenkonzentration von 0,1 vol% erfolgt nicht kontinuierlich sondern diskontinuierlich, wobei der direkte Anstieg des CO₂-Partialdruckes in der Suspension eine erhöhte Photosyntheseleistung der Algenzellen und damit einen ansteigenden dO_2 hervorruft. Diese Hypothese wird allerdings durch das Systemverhalten ohne Algenzellen widerlegt, weil dieses periodische Schwingen der Suspensionsparameter in reinem TAP-Medium ohne zelluläre Aktivität nicht nachgewiesen werden konnte.

Neben dem Systemverhalten ist auch eine biologische Ursache für diesen Effekt nicht auszuschließen. Harris beschreibt eine 6 – 8 stündige Verdopplungszeit für *C. reinhardtii* bei rein vegetativem Wachstum [156]. Der oszillierende dO_2 und dCO_2 könnte demnach ebenfalls eine metabolische Antwort der Algenzellen auf die kohlenstofflimitierenden Bedingungen in der Suspension oder der Hinweis auf eine Synchronisation der Zellpopulation sein. Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von Spudich und Sager (1980) bzw. Voigt und Münzner (1987) unterstützt [157, 158]. Demnach können Zellpopulationen von *C. reinhardtii*, bedingt durch lichtabhängige Bioprozesse während des Zellzyklus, durch zyklische Beleuchtung synchronisiert werden. Da die Vorkultur, die zur Inokulation des MicroLED-Bioreaktors genutzt wurde, zyklischen Beleuchtungsbedingungen von 16/8 h ausgesetzt war, könnte das periodische Schwingen der Suspensionsparameter ebenfalls eine metabolische zellzyklusabhängige Aktivität der Algenzellen widerspiegeln.

Bis zu einer BTM von 0,8 g L⁻¹ nahm der Verlauf des Fluoreszenzsignals des intrazellulären Chlorophylls einen vergleichbaren Trend an. Vergleichbare Beobachtungen wurden von Nebal et al. (2008) beschrieben [159]. Die Autoren detektierten eine ansteigende Chlorophyllfluoreszenz für *Cyanothece* sp. ATCC 51142 bis zu einer BTM von 1,0 g L⁻¹ bevor das Signal einen Sättigungsbereich erreichte. Die Autoren erklärten diesen Effekt durch Absorptionseffekte innerhalb hoher Zelldichten.

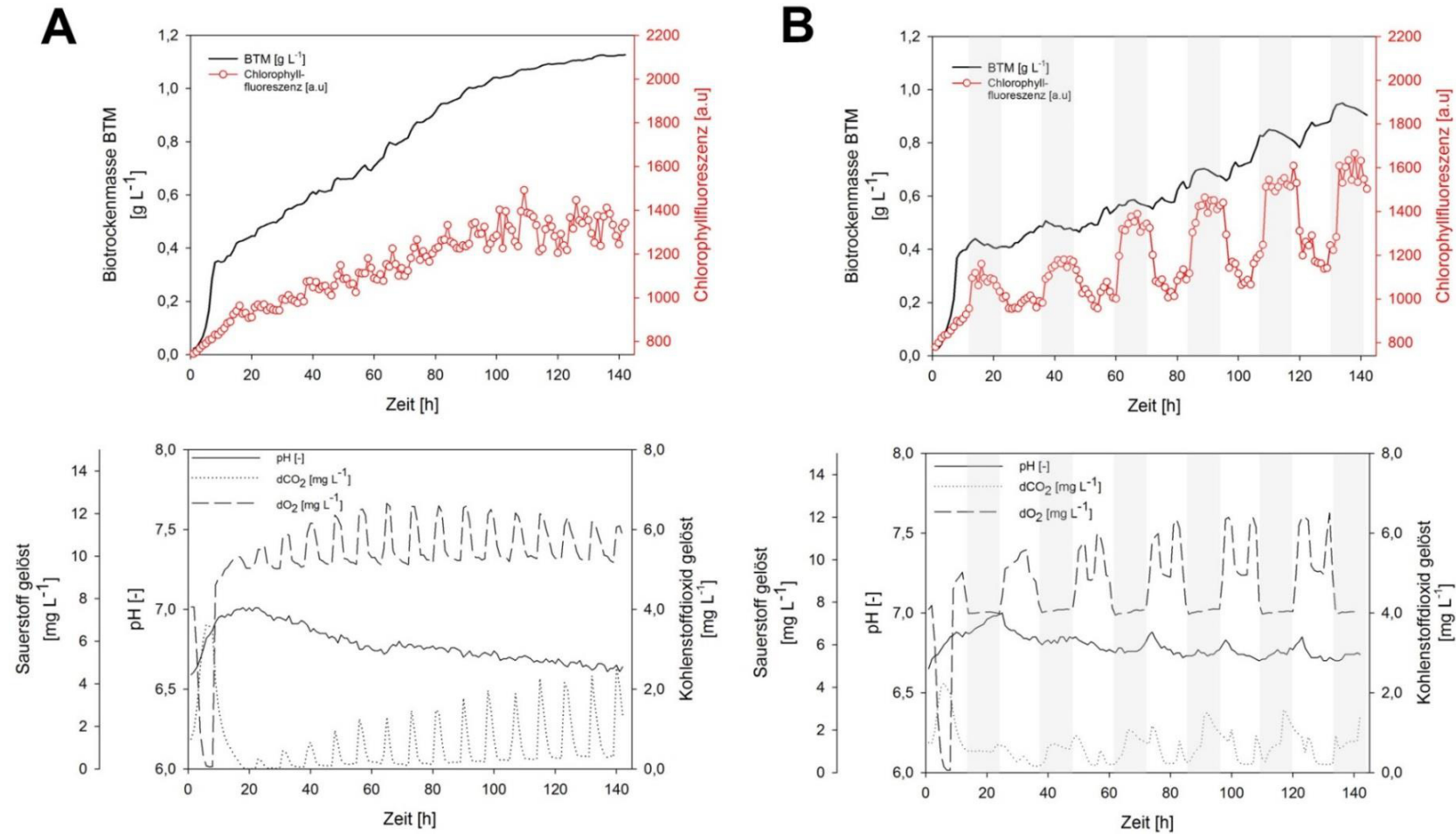


Abbildung 63: Echtzeit-Analyse der Zellkonzentration und Chlorophyllfluoreszenz bzw. der Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH während des photo-mixotrophen Wachstums (TAP-Medium) von *C. reinhardtii* 11.32b im MicrOLED-Bioreaktor unter (A) kontinuierlicher OLED-Beleuchtung und (B) Hell-/Dunkelzyklen von 12/12 h; Kultivierungsparameter: $I_0 = 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,1 vol% CO_2 in wassergesättigter Luft, Begasungsrate: $0,5 \text{ L h}^{-1}$, Temperatur: $26 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Suspensionsparameter und zellspezifischen Eigenschaften unter dem Einfluss von Hell-/Dunkelzyklen von 12/12 h zeigten aufgrund der Beleuchtungsphase zu Beginn der Kultivierung einen identischen Verlauf zu der Kultivierung unter kontinuierlicher Beleuchtung. In den darauffolgenden Dunkelphasen wurde ein geringer Abfall der BTM, jeweils gefolgt von ansteigenden Zellkonzentrationen in den Hellphasen, detektiert. Ein vergleichbarer Verlauf der Zellkonzentration während zyklischer Beleuchtungsbedingungen wurde durch Nedbal et al. (2008) beschrieben [159].

Nach 140 h Kultivierung wurde für die zyklische Hell-/Dunkelkultivierung mit $0,95 \text{ g L}^{-1}$ eine geringere BTM im Vergleich zur kontinuierlichen Beleuchtung mit $1,13 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Ein interessanter Verlauf wurde für das Fluoreszenzsignal des Chlorophylls detektiert. Während der Dunkelphasen zeigte die Chlorophyllfluoreszenz eine signifikant höhere Intensität im Vergleich zu den Beleuchtungsphasen.

Willamme et al. (2015) analysierten die intrazellulären Bestandteile synchronisierter *C. reinhardtii* 137c Kulturen, die zyklischen Beleuchtungsbedingungen ausgesetzt wurden [160]. Die Autoren stellten fest, dass der intrazelluläre Chlorophyllgehalt in beiden Beleuchtungsphasen konstant blieb. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität während der Dunkelphasen ist demnach kein Resultat einer erhöhten intrazellulären Chlorophyllkonzentration. Stattdessen ist der so genannte Kautsky-Effekt, der die Effizienz der photochemischen Prozesse im Photosystem II (PS II) beschreibt, für das verstärkte Fluoreszenzsignal verantwortlich. In Phasen von geringen Lichtintensitäten wird die intrazelluläre Konzentration der Elektronenakzeptoren des PS II, v.a. Plastochinon und Q_A , verringert [121]. Werden die Reaktionszentren der Algenzellen nun durch einen Lichtimpuls angeregt, wie es im Falle der LED-Anregung während der Messphasen im MicroLED-Bioreaktor geschieht, sind die Reaktionszentren schnell „gesättigt“ und die Strahlungsenergie kann nicht über die Elektronentransportkette abfließen. Die überschüssige Strahlungsenergie wird in Form von Fluoreszenz emittiert. Die Effizienz des PS II ist in diesem Zustand reduziert, um eine effektive Nutzung der Zellaktivität zu gewährleisten, d.h. je geringer die Chlorophyllfluoreszenz, desto höher die photosynthetische Effizienz.

Die zyklischen Beleuchtungsphasen sind ebenfalls am Verlauf der Suspensionsparameter zu erkennen. Bedingt durch die fehlende Sauerstoffproduktion bei konstantem O_2 -Verbrauch durch Zellatmung in den Dunkelphasen sank der dO_2 auf die Sättigungskonzentration bei den vorherrschenden Temperaturbedingungen ab, wohingegen im Verlauf der Hellphasen die Konzentration an gelöstem Sauerstoff auf maximal 156 % (= $12,5 \text{ mg L}^{-1}$) der Sättigungskonzentration anstieg. Der geringe CO_2 -Anteil von 0,1 vol% in der zugeführten Luft resultierte

in einem geringen CO₂-Partialdruck in der Flüssigphase. Die über das Henry-Gesetz genäherte Konzentration an gelöstem CO₂ zeigte geringe Werte von unter 2 mg L⁻¹, wobei jeweils zu Beginn der Dunkelphase ein Anstieg der CO₂-Konzentration verzeichnet wurde (vorrangig Zellatmung) und mit einsetzender Beleuchtung die Konzentration an die Nachweisgrenze absank (vorrangig Photosynthese). Der pH-Wert blieb über den betrachteten Versuchszeitraum nahezu konstant. Das periodische Verhalten der Suspensionsparameter dO₂ und dCO₂, das bei der kontinuierlichen Beleuchtung detektiert wurde, zeigte sich während der zyklischen Beleuchtungsbedingungen jeweils in den Hellphasen.

4.3.6 Anwendungsbeispiel II: Optimierung der Prozessbedingungen unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen

Das miniaturisierte FPA-PBR System wurde vor allem für die Bioprozessentwicklung photobiotechnologischer Prozesse im kleinen Maßstab entwickelt. Durch die Miniaturisierung ist eine Parallelisierung der Prozesse für eine zeit- und kosteneffektive Prozessentwicklung möglich. Durch die Ausführung des MicroLED-Bioreaktors als FPA-PBR und die Berücksichtigung der hydrodynamischen Parameter wird zudem eine Skalierbarkeit auf Labor- und Produktionssysteme ermöglicht. Um ein umfassendes Prozessverständnis zu erlangen, ist die Analyse der zellulären Eigenschaften und der Dynamik der Suspensionsbedingungen essentiell. In konventionellen Kultivierungssystemen, z.B. beleuchteten Schüttelkolben können keine Informationen über die Dynamik der Parameter in der Suspension in Echtzeit analysiert werden. Zudem ist die Übertragbarkeit der Bioprozesse in einen größeren Maßstab aufgrund der unterschiedlichen Leistungscharakteristika limitiert. Die wichtigsten Einflussparameter, welche die Performance phototropher Zellen beeinflussen, sind die Intensität der PAR-Strahlung, eine ausreichende Versorgung der Zellen mit gelöstem CO₂, der pH-Wert und die Vermeidung inhibierender Sauerstoffkonzentrationen in der Flüssigphase.

Um einen Anwendungsbereich für die Bioprozessoptimierung zu demonstrieren, wurde in *repeated-batch* Kultivierungen der CO₂-Gehalt der Begasung während des photoautotrophen Wachstums von *C. reinhardtii* 11.32b im HS-Medium variiert und der Einfluss auf die zellspezifischen Parameter und die Suspensionsdynamik untersucht (Abbildung 64). In Abbildung 64A sind der Echtzeitverlauf der BTM und der Chlorophyllfluoreszenz in Abhängigkeit des CO₂-Gehaltes dargestellt.

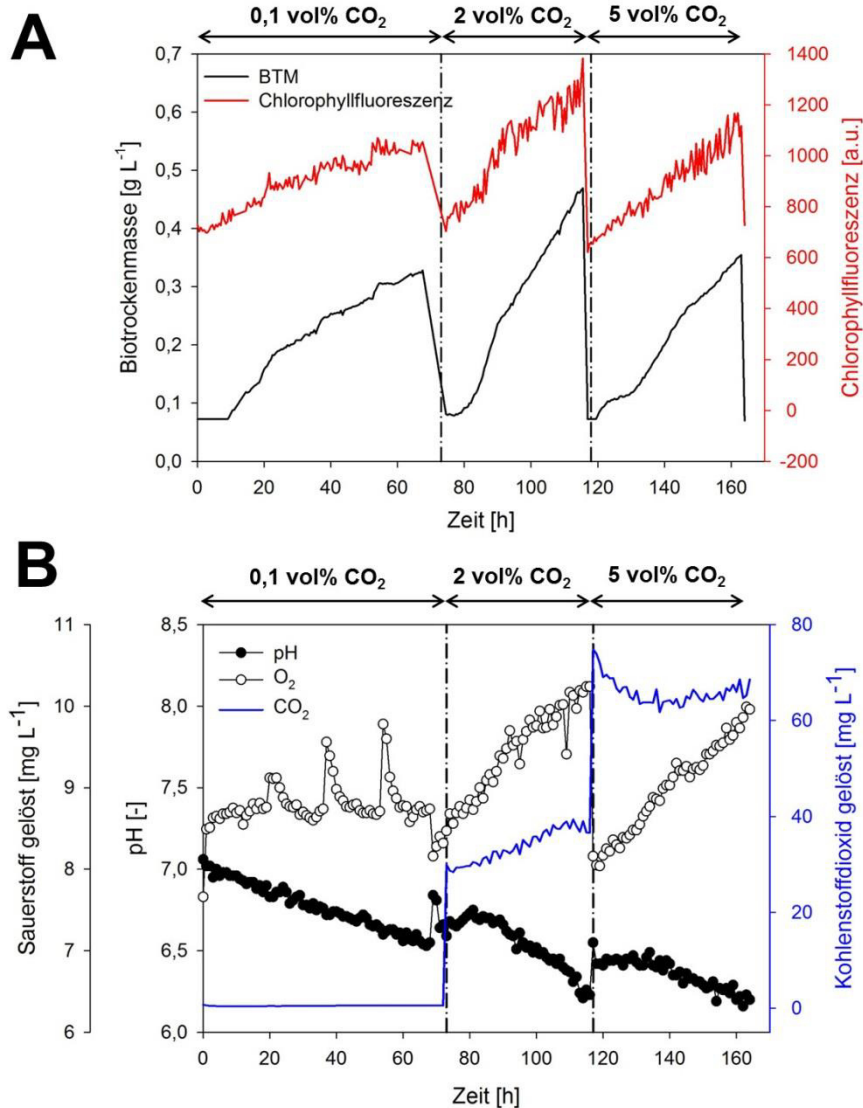


Abbildung 64: Variation des CO₂-Anteiles in der Begasung (0,5 L h⁻¹) während der *repeated-batch* Kultivierung von *C. reinhardtii* 11.32b unter photoautotrophen Bedingungen (HS-Medium), (A) Echtzeit-Biotrockenmassekonz. und Chlorophyllfluoreszenz, (B) Suspensionsparameter dO₂, dCO₂ und pH in Abhängigkeit des CO₂-Gehaltes. Kultivierungsparameter: I₀ = 60 μmol m⁻² s⁻¹, Temperatur: 26 °C. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur ein Versuchsdurchlauf dargestellt.

Anhand der Echtzeitanalyse der Zellkonzentration in der FPA-Kultivierungskammer konnte eine lineare Zunahme der BTM im Kultivierungsverlauf detektiert werden (Abbildung 64A). Bei einer BTM von ca. 0,2 g L⁻¹ wurde in den jeweiligen Wachstumsphasen eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit verzeichnet, die vermutlich durch eine Limitierung der PAR-Intensität bei steigender Selbstabschattung der Algenzellen hervorgerufen wurde. Die BTM-Produktivität von $0,135 \pm 0,03$ g L⁻¹ d⁻¹ bei einem CO₂-Anteil von 0,1 vol% ist vergleichbar zur photoautotrophen Wachstumsphase im TAP-Medium (Abbildung 63). Durch die Erhöhung des CO₂-Anteiles auf 2 vol% konnte die BTM-Produktivität auf $0,235 \pm 0,014$ g L⁻¹ d⁻¹ gesteigert

werden, wohingegen bei weiterer Erhöhung des CO₂-Anteiles auf 5 vol% keine weitere Zunahme der BTM-Produktivität erzielbar war. Da in dieser Studie die ersten Mikroalgen-Kultivierungen mit OLED-Beleuchtung durchgeführt wurden, ist ein belastbarer Vergleich mit Literaturdaten schwierig. Nichtsdestotrotz wurde für ähnliche Kultivierungsbedingungen in anderen PBR-Systemen eine vergleichbare BTM-Produktivität bestimmt. Chinnasamy et al. (2009) erzielten für *Chlorella vulgaris* ARC1 eine BTM-Produktivität von 0,21 g L⁻¹ d⁻¹ [161]. Chiu et al. (2009) beobachteten ebenfalls eine sinkende BTM-Produktivität ab einem CO₂-Gehalt von 5 vol% für *Nannochloropsis oculata* [162]. Unter optimalen Bedingungen (2 vol%) fanden die Autoren eine BTM-Produktivität von 0,480 g L⁻¹ d⁻¹ für ein *repeated-batch* Verfahren mit täglichem Wechsel des Kulturmediums bzw. 0,296 g L⁻¹ d⁻¹ für den Wechsel des Mediums in 3-Tages-Intervallen.

Tabelle 9: Biotrockenmasse-Produktivität, max. Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Flüssigphase in Abhängigkeit des CO₂-Anteiles in der Begasung. Die Werte repräsentieren den Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

Parameter	0,1 vol% CO ₂	2,0 vol% CO ₂	5,0 vol% CO ₂
Biotrockenmasse-Produktivität [g L ⁻¹ d ⁻¹]	0,135 ± 0,03	0,235 ± 0,014	0,201 ± 0,002
Max. O ₂ -Konzentration [mg L ⁻¹]	9,91 ± 0,13	10,45 ± 0,21	9,93 ± 0,09
Durchschnittliche CO ₂ -Konzentration* [mg L ⁻¹]	0,53 ± 0,08	33,8 ± 3,3	65,9 ± 2,8

* berechnet über das Henry-Gesetz, unter der Annahme konstanter Temperatur- und pH-Wert-Bedingungen

Da die BTM während der *repeated-batch* Versuche 0,8 g L⁻¹ nicht überschritten wurde (siehe Kapitel 4.3.5) und damit keine Fluoreszenzabsorptionseffekte durch hohe Zellkonzentrationen zum Tragen kamen, korrelierten die erzielten Fluoreszenzintensitäten des intrazellulären Chlorophylls direkt mit der BTM-Zunahme.

Die Dynamik der Suspensionsparameter ist in Teilabbildung 64B dargestellt. Der geringe CO₂-Partialdruck bei einem Gasanteil von 0,1 vol% resultierte in einer limitierenden Konzentration an gelöstem CO₂ von ca. 0,53 ± 0,08 mg L⁻¹ in der Flüssigphase. Durch die Erhöhung des CO₂-Anteiles auf 2 vol% bzw. 5 vol% wurde in der Flüssigphase eine durchschnittliche CO₂-Konzentration von 33,8 ± 3,3 mg L⁻¹ bzw. 65,9 ± 2,8 mg L⁻¹ detektiert. Bei der geringen Konzentration an gelöstem CO₂ (0,1 vol%) in der Flüssigphase wurde wiederum ein periodi-

ches Schwingen des dO_2 mit einer durchschnittlichen max. Gelöst-Konzentration von $9,91 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$ detektiert. Im Gegensatz dazu, zeigte der dO_2 , der die Photosyntheseleistung der Algenzellen widerspiegelt, einen linearen Anstieg bei einem CO_2 -Anteil von 2 vol% (max. $dO_2 = 10,45 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$) und 5 vol% (max. $dO_2 = 9,93 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$). Der pH-Wert des HS-Mediums sank im Verlauf der einzelnen batch-Phasen, bedingt durch den Einfluss des steigenden CO_2 -Partialdruckes, auf das Kohlensäure-Gleichgewicht

Die installierten optischen Sensorspots eignen sich unter den im MicroLED-Bioreaktor vorherrschenden Bedingungen sehr gut für die Analyse der Suspensionsparameter.

Da gelöstes CO_2 den photosynthetisch aktiven Zellen als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, ist die CO_2 -Versorgung einer der wichtigsten Aspekte bei der photoautotrophen Kultivierung. Die zellulären Mechanismen, v.a. die Sensitivität des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), das für die Fixierung von CO_2 verantwortlich ist, gegenüber CO_2 müssen dabei beachtet werden. In zahlreichen Arbeiten wurde der Einfluss des CO_2 -Gehaltes auf die Performance von photobiotechnologischen Prozessen untersucht. Yang und Gao (2003) beschrieben für *C. reinhardtii* eine vergleichbare Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit unter photoautotrophen Bedingungen vom CO_2 -Anteil, wie sie in dieser Studie identifiziert wurde [163]. Gardner et al. (2013) berichten, dass atmosphärische CO_2 -Bedingungen (= 0,0036 vol%) in einer Limitation an gelöstem Kohlenstoff in der Flüssigphase resultieren [164]. Bei einem CO_2 -Gehalt von 5 vol% fanden die Autoren für *C. reinhardtii* die höchste Produktivität von kohlenstoffbasierten Vorstufen, v.a. Triacylglycerol, für die Biokraftstoffproduktion. Für *Chlorella vulgaris* konnte gezeigt werden, dass sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit als auch der K_M -Wert der CO_2 -Fixierungskinetik durch die Erhöhung des CO_2 -Anteiles von 0,04 vol% auf 4,0 vol% gesteigert werden konnte [165]. Die durch die nichtinvasiven optischen Sensoren ermittelten Konzentrationen an gelöstem CO_2 gehen mit den Beobachtungen der vorgestellten Arbeiten einher. Chinnasamy et al. (2009) bezifferten die CO_2 -Verbrauchsraten für *C. vulgaris* ARC1 zu $18,3 \text{ mgCO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (0,036 vol%) bzw. $38,4 \text{ mgCO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (6 vol%) [161]. Die im MicroLED-Bioreaktor gemessene CO_2 -Konzentration von durchschnittlich $0,53 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$ bei einem CO_2 -Anteil von 0,1 vol% sind demnach zu gering, um eine effektive CO_2 -Fixierung zu gewährleisten.

Für die genutzten Lichtbedingungen im MicroLED-Bioreaktor wurde ein CO_2 -Anteil von 2 vol% (= $33,8 \pm 3,3 \text{ mg L}^{-1}$) als optimale Kultivierungsbedingungen für *C. reinhardtii* 11.32b ermittelt.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein auf der Basis moderner Licht-, Fertigungs- und Sensortechnologien entwickelter miniaturisierter Flat-Panel-Airlift-(FPA) Photobioreaktor, der für die Bioprozessentwicklung bzw. ein gezieltes Stammscreening im kleinen parallelisierbaren Maßstab eingesetzt werden kann, beschrieben und bewertet. Mit Hilfe der additiven Fertigung (3D-Druck) wurden komplexe Bioreaktorkomponenten, die für die Integration der elektronischen und optischen Elemente (LED-Anregung, Photodioden, Leiterplatten) genutzt wurden, aus Polyamid gefertigt.

Die lichtspezifische Charakterisierung der erstmals in Photobioreaktoren verwendeten organischen lichtemittierenden Dioden (OLED) ergab eine emittierte PAR-Intensität von 35,31 %. Durch das Konzept der zweiseitigen Beleuchtung wurde ein homogenes Intensitätsprofil mit bis zu $151 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über den Querschnitt der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer erzielt. Diese Intensität ist für die Untersuchung lichtabhängiger zellulärer Prozesse ausreichend.

Die hydrodynamische Charakterisierung der FPA-Kultivierungskammer zeigte, dass der Stofftransport (k_{La}), die Mischzeit (t_m) und der Gas hold-up (ϵ_G) vergleichbar zu Labor- und Produktions-FPA-Bioreaktoren ist, wodurch das Potential für die Übertragbarkeit der Bioprozesse vom Kleinkultivierungsmaßstab in größere Maßstäbe verdeutlicht wird.

Am Beispiel von zwei Anwendungsszenarien konnte gezeigt werden, dass die Analyse der zellspezifischen Eigenschaften und der Suspensionsdynamik in Echtzeit einen erheblichen Informationsgehalt für die Bioprozessentwicklung liefert und sowohl die metabolische Aktivität der Algenzellen als auch potentielle Limitierungen identifizieren kann.

Für weiterführende Arbeiten ist es essentiell, die Übertragbarkeit der Bioprozesse vom Milliliter-Maßstab auf Labor- und Produktionssysteme zu evaluieren. Neben den warmweißen OLED-Modulen sollten monochromatische organische Emitter evaluiert werden, um die PAR-Effizienz der Lichtquellen zu erhöhen. Zur Weiterführung von Studien im Bereich der Photoinhibition ist die Entwicklung und Evaluierung von LED-basierten Lichtquellen zu empfehlen. Da zum aktuellen Stand der Entwicklung der miniaturisierte FPA-PBR nur für den Satzbetrieb ausgelegt ist, wird eine Überarbeitung des Reaktordesigns dahingehend empfohlen, um über die Zu- bzw. Abfuhr von Medien (inkl. Zellen) einen kontinuierlichen Betrieb zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Entwicklung und Evaluierung neuer Kultivierungskonzepte für phototrophe Mikroorganismen, die ein vertieftes Prozessverständnis für photobiotechnologische Prozesse und die Physiologie der Zellen ermöglichen.

Im Einleitungskapitel wurden sowohl biologische als auch technische Aspekte der Photobiotechnologie diskutiert. Im Zuge der biologischen Aspekte wurden die Bioprozesse der oxygenen und anoxygenen Photosynthese vorgestellt und die metabolischen Unterschiede erläutert. Neben den biochemischen Abläufen ist die Versorgung der zellulären Lichtsammelkomplexe eine essentielle Voraussetzung der Photobiotechnologie. Dazu wurden die zellspezifischen Absorptionseigenschaften verschiedener photosynthetisch aktiver Organismen herausgearbeitet. Um photosynthesegetriebene Prozesse für biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen, sind technische Systeme zur Kultivierung der Organismen, sogenannte Photobioreaktoren, notwendig. Um einen Überblick über den Stand der Technik im Bereich der Photobioreaktortechnik zu geben (technische Aspekte der Photobiotechnologie), wurden Photobioreaktoren vom Screening- bis zum Produktionsmaßstab vorgestellt und die jeweiligen Vor- und Nachteile diskutiert.

Für ein verbessertes Prozessverständnis der zellspezifischen Bedingungen von lichtabhängigen Bioprocessen und eine gezielte Prozessentwicklung ist eine detaillierte Beschreibung der Einflussnahme der Prozessparameter auf die Physiologie der Zellen insbesondere auf deren Produktivität erforderlich. Dazu müssen Methoden entwickelt werden, welche die Heterogenität der Lichtbedingungen für die katalytisch aktiven Einheiten im Reaktorvolumen beschreiben. Das zweite Kapitel stellt die Prozessentwicklung zur photofermentativen Wasserstoffproduktion durch das Nichtschwefelpurpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158 dar. Der unter anaeroben Bedingungen durch das membranassoziierten Nitrogenase-Enzymsystem katalysierte Prozess wurde in einem selbstkonzipierten Halogen-Photobioreaktor, der erstmals die Untersuchung von Bestrahlungsstärken von bis zu 2500 W m⁻² ermöglichte, durchgeführt. Die Prozessbedingungen wurden für den volumetrischen Leistungseintrag (P_0/V_L) und die mittlere Bestrahlungsstärke (I_0) im Satzbetrieb untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *R. sphaeroides* DSM158 bei einer durchschnittlichen I_0 von 2250 W m⁻² und einem P_0/V_L von 0,55 kW m⁻³ im Satzbetrieb eine maximale Wasserstoffproduktionsrate von 195 mL L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Die zeitlich und lokal veränderlichen Prozessbedingungen für die Biomassekonzentration (BTM) und das C:N-Verhältnis im Satzbetrieb erlaubten allerdings keine detaillierten Aussagen über den Einfluss der einzelnen Bedingungen auf die Produktivität auf der zellulären Ebene. Die Photofermentation wurde durch das Zuschalten eines Zu- und Ablaufs in einen kontinuierlichen Prozess überführt. Nach einer 80-

stündigen Übergangsphase stellten sich im Reaktorvolumen konstante, d.h. Fließgleichgewichtsbedingungen für die BTM- und Substratkonzentrationen ein. Durch die konstante BTM-Konzentration unter Fließgleichgewichtsbedingungen wurden die Lichtzonen, die sich über den Querschnitt des Halogen-Photobioreaktors bedingt durch Absorptions-, Selbstabschattungs-, und Streueffekte ausbilden, und das C:N-Verhältnis über das Reaktorvolumen fixiert. Mit Hilfe der optischen *Ray-Tracing* Simulation und einem empirischen 3-parametrischen Modellierungsansatz zur Strahlungsverteilung in einem zylindrischen Reaktorgefäß wurde die Strahlungsintensitätsverteilung für die gegebenen Fließgleichgewichtsbedingungen im Halogen-Photobioreaktor simuliert. Unter kontinuierlicher Prozessführung konnte in Bezug auf die volumetrische Wasserstoffproduktionsrate eine optimale Durchflussrate D [h^{-1}] von $0,096 \text{ h}^{-1}$ identifiziert werden. Weil die durch den Rührer induzierten Strömungsbedingungen einen direkten Einfluss auf die Bewegung der Zellen durch die Lichtzonen haben, wurde die Rührkesselgeometrie in COMSOL-Multiphysics implementiert und CFD-Analysen für verschiedene Strömungsszenarien durchgeführt. Die Simulationsergebnisse zeigten, dass eine gerichtete Strömung zur bestrahlten Reaktorwandung im schwachturbulenten Milieu optimale Bedingungen für die photofermentative Wasserstoffproduktion darstellen. Dies konnte experimentell belegt werden und lieferte mit $170,5 \pm 2.2 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine um den Faktor 2,64 höhere Produktivität als in vergleichbaren Literaturstudien dargestellt. Steigende Rührer-Reynoldszahlen führten zu höheren Fluidgeschwindigkeiten; allerdings induzierte der höhere Turbulenzgrad ungerichtete tangentielle Strömungen im Reaktorvolumen, die in einer Verringerung der zellulären Strahlungsverfügbarkeit und einem Rückgang der Wasserstoffproduktionsrate resultierten.

Anhand der steigenden biomassebezogenen Produktivität unter kontinuierlicher Prozessführung mit steigender Durchflussrate D [h^{-1}] wird geschlossen, dass eine weitere Steigerung der Wasserstoffproduktionsrate realistisch ist, wenn die Strahlungsenergie den phototrophen Bakterien effizienter zur Verfügung gestellt wird. Dazu ist ein Übergang zu Reaktorsystemen mit geringerer Schichtdicke unumgänglich. Die Nutzung von photokatalytisch aktiven Biofilmen ist eine weitere Alternative, um ein Sedimentieren der Zellen unter anaeroben Bedingungen zu vermeiden und neue Photobioreaktorkonzepte zu entwickeln.

Kapitel 3 zeigt die Entwicklung und Evaluierung einer neuen Immobilisierungsmethode für Mikroalgen basierend auf der 3D-Bioprinting-Technologie, die im *Tissue Engineering* für die Herstellung von dreidimensionalen Gewebsstrukturen genutzt wird. Die Immobilisierung von photosynthetisch aktiven Organismen weist mehrere Vorteile auf, z.B. eine bessere Abtrennung der Zellen vom umgebenden Medium im *Downstream Processing* oder eine gezielte Rückhaltung der Zellen in mehrstufigen Prozessen. Die Herstellung von mikroalgenbeladenen strukturierten Hydrogelen ermöglicht zudem zeit- und orts aufgelöste Untersu-

chungen zur Physiologie der Zellen in Abhängigkeit der Prozessparameter. Damit kann der Prozess sowohl auf der Mikro- als auch der Makroebene optimiert werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass mit Hilfe des 3D-Bioprintings Mikroalgen homogen in einer strukturierten Hydrogelmatrix immobilisiert werden können. Die Mikroalgen überlebten den Extrusionsprozess und zeigten eine hohe Viabilität nach 24 h Inkubation unter photoautotrophen Bedingungen. Die im Kultivierungsverlauf innerhalb der Hydrogelmatrix gebildeten Zellcluster zeigten eine hohe photosynthetische Aktivität und Viabilität. Um einen Vergleich zwischen immobilisierten und suspendierten Mikroalgenkulturen zu ermöglichen, wurde für Suspensionskulturen eine durchflusszytometrische Viabilitätsanalyse mit Hilfe des membranpotential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC₄(3) etabliert, der mit hoher Sensitivität den physiologischen Zustand der Zellpopulation widerspiegelte. In einer vergleichenden Studie wurden sowohl für immobilisierte als auch Suspensionskulturen von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 der Einfluss der Prozesstemperatur und der Beleuchtungsbedingungen auf die Populationsviabilität und die Wachstumsraten untersucht. Die Viabilität der eingebetteten Mikroalgen wurden über fluoreszenzmikroskopische Analysen und eine Fiji-basierte Bildanalyse durchgeführt. Die Kultivierung der Mikroalgen in Form suspendierter Kulturen ergab eine starke Abhängigkeit der Populationsviabilität und der Wachstumsrate von der Prozesstemperatur und den Beleuchtungszyklen ($\mu = 0,3 \text{ d}^{-1} - 1,2 \text{ d}^{-1}$), wobei zyklisch beleuchtete Kulturen homogene Zellpopulationen mit intakter polarisierter Zellmembran hervorbrachten. Immobilisierte Mikroalgen zeigten dagegen stabile Wachstumsraten zwischen $0,4 \text{ d}^{-1} - 0,7 \text{ d}^{-1}$, unabhängig von der Prozesstemperatur und den eingestellten Beleuchtungszyklen. Durch einen schützenden Effekt der Hydrogelmatrix wurden jeweils höhere Wachstumsraten für die immobilisierten Mikroalgenkulturen bei 37 °C und kontinuierlicher Beleuchtung im Vergleich zu den äquivalenten Suspensionskulturen erzielt. Durch die Einbettung in die Hydrogelmatrix konnte zudem die Populationsviabilität bei kontinuierlicher Beleuchtung signifikant verbessert werden.

Die Technologie des 3D-Bioprintings ermöglicht zahlreiche Applikationen in der Grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung. Da die Eigenschaften der Hydrogelmatrix durch die Wahl der Materialien und die Parameter des Herstellungsprozesses beeinflusst werden können, ist eine detaillierte Untersuchung von Einflussparametern auf die eingebetteten Zellen möglich. Die Methode des 3D-Bioprinting kann zudem auf weitere Organismen erweitert werden und bietet somit die Potenzialität zellulären Wechselwirkungen und Interaktionen zu untersuchen bzw. ein Modellsystem für symbiotisch lebende Organismen darzustellen. Da das 3D-Bioprinting die zeitliche Verarbeitung von bis zu drei verschiedenen Zelltypen bzw. Materialien ermöglicht, ist für biotechnologische Anwendungen die Etablierung von Kaskadenreaktionen denkbar, indem die Stoffwechseleinstellungen verschiedener Zelltypen für die stufenweise Synthese eines Zielproduktes genutzt werden.

Ein limitierender Aspekt der Photobiotechnologie im Labormaßstab ist die Verfügbarkeit der künstlichen Lichttechnologien. Kommerzielle Photobioreaktoren sind typischerweise mit Leuchtstoffröhren oder lichtemittierenden Dioden (LED) ausgestattet, um die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) den Zellen zur Verfügung zu stellen. Der Screeningmaßstab, der eine hohe Parallelisierung der Prozesse und damit eine zeit- und ressourceneffiziente Bioprozessentwicklung ermöglicht, wurde für heterotrophe Organismen bereits erschlossen und liefert durch die Nutzung optischer Sensoren im Milliliter- bis Mikrolitermaßstab detaillierte Informationen über die Dynamik des Bioprozesses. Um diesen Maßstab auch in der Photobiotechnologie zu etablieren, wurde der MicrOLED-Bioreaktor, ein miniaturisiertes ($V = 15$ mL) und multispektrales Flat-Panel-Airlift-(FPA) Bioreaktorsystem entwickelt, das mittels nichtinvasiver optischer Prozessüberwachung zellspezifische (Zelldichte und Fluoreszenz) und Suspensionsparameter (pH, dO_2 und dCO_2) in Echtzeit analysiert. Die komplexen Reaktorkomponenten des MicrOLED-Bioreaktors, die optische und elektronische Elemente zur Ansteuerung der Lichtquellen und der optischen Sensorik beinhalten, wurden mit Hilfe des Selektiven Lasersinterns, einer additiven Fertigungstechnologie, innerhalb weniger Tage aus Polyamid hergestellt.

Im Zuge der Entwicklung des MicrOLED-Bioreaktors erfolgte erstmals der Einsatz organisch lichtemittierender Dioden (OLEDs) in einem Photobioreaktor. Die Lichtemission der Flächenlichtquellen wurde hinsichtlich ihrer PAR-Effizienz analysiert und vergleichbare Werte (ca. 35 % PAR-Emission) zu LED-Lichtquellen entsprechend dem Stand der Technik ermittelt. Einzelne OLED-Module erreichten eine Photonendichte (PFD) von $83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wobei durch das Konzept der beidseitigen Beleuchtung für geringe Zellkonzentrationen homogene PFD-Verteilungen von max. $151 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über den Querschnitt der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer erreicht wurden.

Durch das FPA-Konzept des MicrOLED-Bioreaktors konnten im Downcomer der FPA-Kultivierungskammer über eine LED-Anregung und RGB-Photodioden die Zellkonzentration und Chlorophyllfluoreszenz ohne Blaseninterferenzen in Echtzeit optisch analysiert werden. Die Detektion der Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH erfolgte im Riser mit Hilfe optischer Sensorspots, die an der Innenseite der FPA-Kultivierungskammer integriert und durch die transparente PMMA-Wand ausgelesen wurden. Die Echtzeitdynamik der Suspensionsparameter ermöglicht detaillierte Aussagen über die Prozessbedingungen und zelluläre Mechanismen der Mikroalgen.

Um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse im Screeningmaßstab mit Kultivierungssystemen im Labor- und Produktionsmaßstab zu evaluieren, wurden hydrodynamische Untersuchungen der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer vorgenommen. Die hydrodynamische Charakterisierung zeigte, dass der Stofftransport ($k_L a$), die Mischzeit (t_m) und der Gas hold-up (ϵ_G)

vergleichbar zu geometrisch ähnlichen FPA-Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 50 L bzw. 250 L sind (Literaturvergleich). Das *scale-up* Potenzial des MicrOLED-Bioreaktors sollte in weiterführenden Studien jedoch noch experimentell belegt werden.

Für zwei Anwendungsszenarien in der Bioprozessentwicklung von Mikroalgenprozessen wurde der MicrOLED-Bioreaktor evaluiert. Mit Hilfe der Echtzeitanalyse der Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH konnte die Stoffwechselaktivität von *C. reinhardtii* 11.32b beim Vorhandensein der Kohlenstoffquelle Acetat detailliert verfolgt werden. Es wurde festgestellt, dass sich das mixotrophe Algenwachstum in eine heterotrophe und photoautotrophe Wachstumsphase gliedert. Als ein weiterer wichtiger Aspekt der Bioprozessentwicklung wurde die Optimierung der photoautotrophen Kultivierungsbedingungen in Bezug auf den CO_2 -Anteil der Begasung untersucht. Ein CO_2 -Anteil im Begasungsmedium von 0,1 vol% führte zur Limitation an gelöstem CO_2 in der Flüssigphase während des Mikroalgenwachstums. Für die betrachteten Kultivierungsbedingungen wurde ein CO_2 -Anteil von 2,0 vol%, der in einer Gelöst-Konzentration von $33,8 \pm 3,3 \text{ mgCO}_2 \text{ L}^{-1}$ resultierte, als optimale Bedingungen identifiziert.

Neben den in dieser Studie eingesetzten warmweißen OLED-Modulen sollten monochromatische organische Emittter für den Einsatz in miniaturisierten Photobioreaktoren evaluiert werden, um die PAR-Effizienz der Lichtquellen zu erhöhen. Um Studien bei höheren Photonenflussdichten zu realisieren, ist ein Übergang zu LED-basierten Lichtquellen unumgänglich. In der weiteren Entwicklung des MicrOLED-Bioreaktors ist die Realisierung einer kontinuierlichen Prozessführung durch die Integration von Mikropumpen und eine zentrale Prozessleitsoftware zur Steuerung und Regelung vorgesehen.

Die Anforderungen an Laborkultivierungssysteme für phototrophe Mikroorganismen werden durch den Prozess und die zellulären Eigenschaften definiert. Ein Kultivierungssystem, das alle biologischen und technischen Aspekte optimal vereint, ist nicht realistisch, da die biologische Vielfalt der Organismen und deren spezifischen Eigenschaften zu groß sind. Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Kultivierungssysteme und Methoden zur Beschreibung der Prozessbedingungen ist eine detaillierte Prozessanalyse und Untersuchung der physiologischen Eigenschaften der katalytisch aktiven Einheiten möglich. Somit ist ein wichtiger Beitrag für die Entwicklung regenerativer und nachhaltiger photosynthesegetriebener Bioprosesse erbracht.

Literaturverzeichnis

- [1] BMBF. Bioökonomie in Deutschland: Chancen für eine biobasierte und nachhaltige Zukunft. 2014.
- [2] Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27:1185-93.
- [3] Marktanalyse im EU Projekt: BlueBio - Blue Biotechnology for Sustainable Innovations, 2013.
- [4] Schulze PSC, Barreira LA, Pereira HGC, Perales JA, Varela JCS. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*. 2014;32:422-30.
- [5] Miyashita H, Diversity of marine phototrophs, in: S.K. Kim (Eds.), *Handbook of Marine Biotechnology*, Elsevier, London, 2015, p. 30.
- [6] Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krausz N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*. 2001;411:909-17.
- [7] Zouni A, Witt H-T, Kern J, Fromme P, Krausz N, Saenger W, et al. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*. 2001;409:739-43.
- [8] Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*. 1993;57:725-49.
- [9] Saga Y, Shibata Y, Tamiaki H. Spectral properties of single light-harvesting complexes in bacterial photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2010;11:15-24.
- [10] Semenov AY, Kurashov VN, Mamedov MD. Transmembrane charge transfer in photosynthetic reaction centers: Some similarities and distinctions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011;104:326-32.
- [11] Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*. 2004;303:1831-8.
- [12] Linke K, Ho FM. Water in Photosystem II: Structural, functional and mechanistic considerations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014;1837:14-32.
- [13] Kok B, Forbush B, McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and Photobiology*. 1970;11:457-75.
- [14] Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA. Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science*. 2003;302:1009-14.
- [15] Bryant DA, Frigaard N-U. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*. 2006;14:488-96.

- [16] Golomysova A, Gomelsky M, Ivanov PS. Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010;35:12751-60.
- [17] Weber J, **Krujatz F**, Hilpmann G, Grützner S, Herrmann J, Thierfelder S, et al. Biotechnological hydrogen production by photosynthesis. *Engineering in Life Sciences*. 2014;14:592-606.
- [18] Rorrer GL, Bioprocess engineering of phototrophic marine organisms, In: S.K. Kim, editors. *Handbook of Marine Biotechnology*, Elsevier; 2015. p. 261-267.
- [19] Socher ML, Lenk F, Geipel K, Schott C, Püschel J, Haas C, et al. Phototrophic growth of *Arthrospira platensis* in a respiration activity monitoring system for shake flasks (RAMOS®). *Engineering in Life Sciences*. 2014;14:658-66.
- [20] Kandilian R, Tsao T-C, Pilon L. Control of incident irradiance on a batch operated flat-plate photobioreactor. *Chemical Engineering Science*. 2014;119:99-108.
- [21] Taleb A, Pruvost J, Legrand J, Marec H, Le-Gouic B, Mirabella B, et al. Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource Technology*. 2015;177:224-32.
- [22] Posten C. Design principles of photobioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*. 2009;9:165-77.
- [23] Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;57:287-93.
- [24] Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 2008;99:4021-8.
- [25] DECHEMA. Positionspapier Algenbiotechnologie: Bestandsaufnahme, Vision und strategische Weiterentwicklung. 2009.
- [26] Ray I, Chakraborty T, Roy D, Datta A, Mandal BK. Production, storage and properties of hydrogen as internal combustion engine fuel: a critical review. *International Journal of Engineering Technology and Advanced Engineering*. 2013;3:119-25.
- [27] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*. 2009;139:244-60.
- [28] Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina. Leitpapier Bioenergie: Möglichkeiten und Grenzen. 2012.
- [29] Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 1998; 117:129-39.
- [30] Dixon R, Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:621-31.
- [31] Golomysova A, Gomelsky M, Ivanov PS. Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010;35:12751-60.

- [32] Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37:12167-74.
- [33] Kumar K, Sirasale A, Das D. Use of image analysis tool for the development of light distribution pattern inside the photobioreactor for the algal cultivation. *Bioresource Technology*. 2013;143:88-95.
- [34] Kim D-H, Son H, Kim M-S. Effect of substrate concentration on continuous Photo-fermentative hydrogen production from lactate using *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37:15483-8.
- [35] Eroglu N, Aslan K, Gündüz U, Yücel M, Türker L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. In: R. Osinga JTJGB, Wijffels RH, editors. *Progress in Industrial Microbiology*: Elsevier; 1999. p. 103-13.
- [36] Han H, Jia Q, Liu B, Yang H, Shen J. Fermentative hydrogen production from acetate using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2013;38:10773-8.
- [37] Hübner P, Willison JC, Vignais PM, Bickle TA. Expression of regulatory nif genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*. 1991;173:2993-9.
- [38] Kim D-H, Kim M-S. Semi-continuous photo-fermentative H₂ production by *Rhodobacter sphaeroides*: Effect of decanting volume ratio. *Bioresource Technology*. 2012;103:481-3.
- [39] Pattanamane W, Choorit W, Kantachote D, Chisti Y. Repeated-batch production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* S10. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37:15855-66.
- [40] Yetis M, Gündüz U, Eroglu I, Yücel M, Türker L. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2000;25:1035-41.
- [41] Li X, Dai Z-Z, Wang Y-H, Zhang S-L. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using fed-batch operation based on ORP level. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011;36:12794-802.
- [42] Zagrodnik R, Thiel M, Seifert K, Włodarczak M, Łaniecki M. Application of immobilized *Rhodobacter sphaeroides* bacteria in hydrogen generation process under semi-continuous conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2013;38:7632-9.
- [43] Fascetti E, Todini O. *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995;44:300-5.
- [44] Csögör Z, Herrenbauer M, Perner I, Schmidt K, Posten C. Design of a photobioreactor for modelling purposes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 1999;38:517-23.
- [45] Csögör Z, Herrenbauer M, Schmidt K, Posten C. Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journal of Applied Phycology*. 2001;13:325-33.

- [46] Xue S, Zhang Q, Wu X, Yan C, Cong W. A novel photobioreactor structure using optical fibers as inner light source to fulfill flashing light effects of microalgae. *Bioresource Technology*. 2013;138:141-7.
- [47] Huang Q, Yao L, Liu T, Yang J. Simulation of the light evolution in an annular photobioreactor for the cultivation of *Porphyridium cruentum*. *Chemical Engineering Science*. 2012;84:718-26.
- [48] Kong B, Vigil RD. Simulation of photosynthetically active radiation distribution in algal photobioreactors using a multidimensional spectral radiation model. *Bioresource Technology*. 2014;158:141-8.
- [49] Farges B, Laroche C, Cornet J-F, Dussap C-G. Spectral kinetic modeling and long-term behavior assessment of *Arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620 nm) light illumination. *Biotechnology Progress*. 2009;25:151-62.
- [50] Lee C-G. Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1999;4:78-81.
- [51] Nauha EK, Alopaeus V. Modeling method for combining fluid dynamics and algal growth in a bubble column photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*. 2013;229:559-68.
- [52] Perner-Nochta I, Posten C. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology*. 2007;131:276-85.
- [53] Sato T, Yamada D, Hirabayashi S. Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect. *Energy Conversion and Management*. 2010;51:1196-201.
- [54] Zhang T. Dynamics of fluid and light intensity in mechanically stirred photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 2013;168:107-16.
- [55] **Krujatz F**, Härtel P, Helbig K, Haufe N, Thierfelder S, Bley T, et al. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 under intense irradiation. *Bioresource Technology*. 2015;175:82-90.
- [56] Riet, K.v., Tramper, H. 1991. Basic bioreactor design. New York, Marcel Dekker, Inc.
- [57] Ray P, Löser C. Aerobic degradation of toluene in a closed chemostat with and without a head space outlet. *Acta Biotechnologica*. 1994;14:243-50.
- [58] Chen C-Y, Liu C-H, Lo Y-C, Chang J-S. Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*. 2011;102:8484-92.
- [59] Murphy TE, Berberoğlu H. Effect of algae pigmentation on photobioreactor productivity and scale-up: A light transfer perspective. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2011;112:2826-34.
- [60] Pottier L, Pruvost J, Deremetz J, Cornet JF, Legrand J, Dussap CG. A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005;91:569-82.
- [61] Suh IS, Lee SB. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;82:180-9.

- [62] **Krujatz F**, Illing R, Krautwer T, Liao J, Helbig K, Goy K, et al. Light-field-characterization in a continuous hydrogen-producing photobioreactor by optical simulation and computational fluid dynamics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015;112:2439-49.
- [63] Gadhamshetty V, Sukumaran A, Nirmalakhandan N. Photoparameters in photofermentative biohydrogen production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2010;41:1-51.
- [64] Koku H, Eroğlu İ, Gündüz U, Yücel M, Türker L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27:1315-29.
- [65] Wakayama T, Nakada E, Asada Y, Miyake J. Effect of Light/Dark Cycle on Bacterial Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides* RV. In: Finkelstein M, Davison B, editors. *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*: Humana Press; 2000. p. 431-40.
- [66] Kim M-S, Kim D-H, Cha J. Culture conditions affecting H₂ production by phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* KD131. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37:14055-61.
- [67] Uyar B, Eroglu I, Yücel M, Gündüz U, Türker L. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007;32:4670-7.
- [68] Kim M-S, Baek J-S, Lee JK. Comparison of accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006;31:121-7.
- [69] Kars G, Gündüz U, Rakhely G, Yücel M, Eroğlu İ, Kovacs KL. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008;33:3056-60.
- [70] Li X, Wang Y-H, Zhang S-L, Chu J, Zhang M, Huang M-Z, et al. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using a novel strategy — shaking and extra-light supplementation approach. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009;34:9677-85.
- [71] Eroglu E, Melis A. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*. 2011;102:8403-13.
- [72] Meyer J, Kelley BC, Vignais PM. Effect of light nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*. 1978;136:201-8.
- [73] Androga DD, Sevinç P, Koku H, Yücel M, Gündüz U, Eroglu I. Optimization of temperature and light intensity for improved photofermentative hydrogen production using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014;39:2472-80.
- [74] Wakayama T, Miyake J. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27:1495-500.

- [75] Tao Y, He Y, Wu Y, Liu F, Li X, Zong W, et al. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008;33:963-73.
- [76] Chisti Y, Flickinger MC. Shear Sensitivity. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2009.
- [77] Zijffers J-WF, Salim S, Janssen M, Tramper J, Wijffels RH. Capturing sunlight into a photobioreactor: Ray tracing simulations of the propagation of light from capture to distribution into the reactor. *Chemical Engineering Journal*. 2008;145:316-27.
- [78] Wang J, Wan W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009;34:235-44.
- [79] Lestinsky P, Vayrynen P, Vecer M, Wichterle K. Hydrodynamics of airlift reactor with internal circulation loop: Experiment vs. CFD Simulation. *Procedia Engineering*. 2012;42:892-907.
- [80] Costes J, Couderc JP. Study by laser Doppler anemometry of the turbulent flow induced by a Rushton turbine in a stirred tank: Influence of the size of the units—I. Mean flow and turbulence. *Chemical Engineering Science*. 1988;43:2751-64.
- [81] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101:87-96.
- [82] Zhu LD, Hiltunen E, Antila E, Zhong JJ, Yuan ZH, Wang ZM. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;30:1035-46.
- [83] Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 2006;64:1-10.
- [84] Morita M, Watanabe Y, Saiki H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000;87:203-18.
- [85] Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;57:414-33.
- [86] DeFail AJ, Chu CR, Izzo N, Marra KG. Controlled release of bioactive TGF- β 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27:1579-85.
- [87] Varghese LR, Das N. Removal of Hg (II) ions from aqueous environment using glutaraldehyde crosslinked nanobiocomposite hydrogel modified by TETA and β -cyclodextrin: Optimization, equilibrium, kinetic and ex situ studies. *Ecological Engineering*. 2015;85:201-11.
- [88] Wu B-C, McClements DJ. Chapter 7 - Engineering Hydrogel Microspheres for Healthy and Tasty Foods A2 - Sagis, Leonard M.C. *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 131-49.
- [89] Yoshida R, Sakai K, Okano T, Sakurai Y. Modern Hydrogel Delivery Systems Pulsatile drug delivery systems using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;11:85-108.

- [90] Lupi FR, Gentile L, Gabriele D, Mazzulla S, Baldino N, de Cindio B. Olive oil and hyperthermal water bigels for cosmetic uses. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;459:70-8.
- [91] Jamnongkan T, Kaewpirom S. Potassium release kinetics and water retention of controlled-release fertilizers based on chitosan hydrogels. *Journal of Polymers and the Environment*. 2010;18:413-21.
- [92] Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:1646-62.
- [93] Landers R, Mülhaupt R. Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2000;282:17-21.
- [94] Schütz K, Placht A-M, Paul B, Brüggemeier S, Gelinsky M, Lode A. Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015:n/a-n/a.
- [95] Müller S, Harms H, Bley T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;21:100-13.
- [96] Bley T. From Single Cells to Microbial Population Dynamics: Modelling in Biotechnology Based on Measurements of Individual Cells. In: Müller S, Bley T, editors. *High Resolution Microbial Single Cell Analytics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 211-27.
- [97] Gallo-Villanueva R, Jesús-Pérez N, Martínez-López J, Pacheco A, Lapizco-Encinas B. Assessment of microalgae viability employing insulator-based dielectrophoresis. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011;10:1305-15.
- [98] Vavilin DV, Ducruet J-M, Matorin DN, Venediktov PS, Rubin AB. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1998;42:233-9.
- [99] Hyka P, Lickova S, Přibyl P, Melzoch K, Kovar K. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*. 2013;31:2-16.
- [100] Jamers A, Lenjou M, Deraedt P, Bockstaele DV, Blust R, Coen Wd. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology*. 2009;44:541-50.
- [101] Prado R, Rioboo C, Herrero C, Suárez-Bregua P, Cid Á. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology*. 2012;21:409-20.
- [102] Stauber JL, Franklin NM, Adams MS. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnology*. 2002;20:141-3.
- [103] Imase M, Ohko Y, Takeuchi M, Hanada S. Estimating the viability of *Chlorella* exposed to oxidative stresses based around photocatalysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;78:1-6.

- [104] Michels MA, van der Goot A, Norsker N-H, Wijffels R. Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Bioprocess Biosystems Engineering*. 2010;33:921-7.
- [105] Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;48:385-407.
- [106] Dorsey J, Yentsch CM, Mayo S, McKenna C. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry*. 1989;10:622-8.
- [107] Lam MK, Lee KT. Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*. 2012;191:263-8.
- [108] Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 2008;99:3949-64.
- [109] Thakur A, Kumar HD. Use of natural polymers as immobilizing agents and effects on the growth of *Dunaliella salina* and its glycerol production. *Acta Biotechnologica*. 1999;19:37-44.
- [110] Sing, Y., Photosynthetic activity, and lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of *Botryococcus* in relation to growth phase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003;13:687-91.
- [111] Grizeau D, Navarro JM. Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized within Ca-alginate beads. *Biotechnology Letters*. 1986;8:261-4.
- [112] Ramachandra Rao S, Tripathi U, Ravishankar GA. Biotransformation of codeine to morphine in freely suspended cells and immobilized cultures of *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999;15:465-9.
- [113] Aguilar-May B, del Pilar Sánchez-Saavedra M, Lizardi J, Voltolina D. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. *Journa of Applied Phycology*. 2007;19:181-3.
- [114] Bloch K, Papismedov E, Yavriyants K, Vorobeychik M, Beer S, Vardi P. Photosynthetic oxygen generator for bioartificial pancreas. *Tissue Engineering*. 2006;12:337-44.
- [115] Hopfner U, Schenck T-L, Chávez M-N, Machens H-G, Bohne A-V, Nickelsen J, et al. Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:2712-7.
- [116] Schenck TL, Hopfner U, Chávez MN, Machens H-G, Somlai-Schweiger I, Giunta RE, et al. Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2015;15:39-47.
- [117] Chávez MN, Schenck TL, Hopfner U, Centeno-Cerdas C, Somlai-Schweiger I, Schwarz C, et al. Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials*. 2016;75:25-36.
- [118] **Krujatz F**, Lode A, Brüggemeier S, Schütz K, Kramer J, Bley T, et al. Green bioprinting: Viability and growth analysis of microalgae immobilized in 3D-plotted hydrogels versus suspension cultures. *Engineering in Life Sciences*. 2015;15:678-88.

- [119] Lode A, **Krujatz F**, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, et al. Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications. *Engineering in Life Sciences*. 2015;15:177-83.
- [120] Sineshchekov OA, Jung K-H, Spudich JL. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99:8689-94.
- [121] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 2000;51:659-68.
- [122] Kessler E. Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Systematics and Evolution*. 151:67-71.
- [123] de-Bashan LE, Trejo A, Huss VAR, Hernandez J-P, Bashan Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*. 2008;99:4980-9.
- [124] Boyd AR, Gunasekera TS, Attfeld PV, Simic K, Vincent SF, Veal DA. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Research*. 2003;3:11-6.
- [125] Papadimitriou K, Pratsinis H, Nebe-von-Caron G, Kletsas D, Tsakalidou E. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;111:197-205.
- [126] Peperzak L, Brussaard CPD. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton. *Journal of Phycology*. 2011;47:692-702.
- [127] Xin L, Hong-ying H, Yu-ping Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*. 2011;102:3098-102.
- [128] Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2009;48:1146-51.
- [129] Venkata Subhash G, Rohit MV, Devi MP, Swamy YV, Venkata Mohan S. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. *Bioresource Technology*. 2014;169:789-93.
- [130] Markou G, Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*. 2013;31:1532-42.
- [131] Fadaghi H, Jayasundera K, Krishnan D, Liu X. The Effect of temperature on cell density of wild type and mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Expedition*. 2012;1.
- [132] Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica*. 2007;45:309-11.

- [133] Tamburic B, Zemichael FW, Maitland GC, Hellgardt K. Effect of the light regime and phototrophic conditions on growth of the H₂-producing green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Energy Procedia*. 2012;29:710-9.
- [134] Gonçalves AL, Simões M, Pires JCM. The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*. 2014;85:530-6.
- [135] Han B-P, Virtanen M, Koponen J, Straškraba M. Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. *Journal of Plankton Research*. 2000;22:865-85.
- [136] Keren N, Krieger-Liszkay A. Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiologia Plantarum*. 2011;142:1-5.
- [137] Roach T, Sedoud A, Krieger-Liszkay A. Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013;1827:1183-90.
- [138] Lehr F, Morweiser M, Rosello Sastre R, Kruse O, Posten C. Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics. *Journal of Biotechnology*. 2012;162:89-96.
- [139] Nama S, Madireddi SK, Devadasu ER, Subramanyam R. High light induced changes in organization, protein profile and function of photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015;152, Part B:367-76.
- [140] Pane L, Feletti M, Bertino C, Carli A. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquaculture International*. 1998;6:411-20.
- [141] Thejokalyani N, Dhoble SJ. Novel approaches for energy efficient solid state lighting by RGB organic light emitting diodes – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;32:448-67.
- [142] Schulze PSC, Barreira LA, Pereira HGC, Perales JA, Varela JCS. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*. 2014;32:422-30.
- [143] Buckley A. Applications of organic light-emitting diodes (OLEDs): Materials, Devices, Applications, Woodhead Publishing, Philadelphia, 2013.
- [144] Acatech - Deutsche Akademie der Technikwissenschaften. Organische Elektronik in Deutschland - Bewertung und Empfehlung für die Weiterentwicklung. 2011.
- [145] Schwoerer M, Wolf HC. Organische Molekulare Festkörper, Kapitel 11.1 Elektrolumineszenz, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2005.
- [146] Wang J, Zhang F, Zhang J, Tang W, Tang A, Peng H, et al. Key issues and recent progress of high efficient organic light-emitting diodes. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2013;17:69-104.
- [147] Steude A, Jahnelt M, Thomschke M, Schober M, Gather MC. Controlling the behavior of single live cells with high density arrays of microscopic OLEDs. *Advanced Materials*. 2015;27:7657-61.

- [148] Shukla AA, Gottschalk U. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends in Biotechnology*. 2013;31:147-54.
- [149] Komorowsky R: Generative Fertigungsverfahren, Diplomica Verlag, S. 36-47.
- [150] Janel M, Beyer B, Thomschke M, Fehse K, Krujatz F, Leo K. Narrow bandwidth top-emitting OLEDs designed for Rhodamine 6G excitation in biological sensing applications. *Electronics*. 2015;4:982-94.
- [151] Sforza E, Simionato D, Giacometti GM, Bertucco A, Morosinotto T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*. 2012;7:e38975.
- [152] Reyna-Velarde R, Cristiani-Urbina E, Hernández-Melchor DJ, Thalasso F, Cañizares-Villanueva RO. Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2010;49:97-103.
- [153] Sierra E, Ación FG, Fernández JM, García JL, González C, Molina E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*. 2008;138:136-47.
- [154] Massart A, Mirisola A, Lupant D, Thomas D, Hantson A-L. Experimental characterization and numerical simulation of the hydrodynamics in an airlift photobioreactor for microalgae cultures. *Algal Research*. 2014;6, Part B:210-7.
- [155] Pirouzi A, Nosrati M, Shojaosadati SA, Shakhesi S. Improvement of mixing time, mass transfer, and power consumption in an external loop airlift photobioreactor for microalgae cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 2014;87:25-32.
- [156] Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001;52:363-406.
- [157] Spudich JL, Sager R. Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *The Journal of Cell Biology*. 1980;85:136-45.
- [158] Voigt J, Münzner P. The *Chlamydomonas* cell cycle is regulated by a light/dark-responsive cell-cycle switch. *Planta*. 1987;172:463-72.
- [159] Nedbal L, Trtílek M, Červený J, Komárek O, Pakrasi HB. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008;100:902-10.
- [160] Willamme R, Alsafrá Z, Arumugam R, Eppe G, Remacle F, Levine RD, et al. Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under day/night conditions. *Journal of Biotechnology*. 2015;215:20-6.
- [161] Chinnasamy S, Ramakrishnan B, Bhatnagar A, Das KC. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10:518-32.
- [162] Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, Ong S-C, Chen C-H, Lin C-S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*. 2009;100:833-8.

- [163] Yang Y, Gao K. Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 15:379-89.
- [164] Gardner RD, Lohman E, Gerlach R, Cooksey KE, Peyton BM. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013;110:87-96.
- [165] Hogetsu D, Miyachi S. Effects of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*. *Plant and Cell Physiology*. 1977;18:347-52.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Vergleich der Emissionsspektren verschiedener Lichttechnologien, warmweiße lichtemittierende Dioden (LED), Leuchtstoffröhre und Halogenstrahler. Die Markierung bei 780 nm kennzeichnet den Grenzwert zur Unterscheidung von Licht- und Strahlungsquellen.....4
- Abbildung 2:** Übersicht über phototsynthetisch aktive Organismen: (A) Nannochloropsis oculata (nutraingredients.com), (B) Purpurbakterium (pixgood.com), (C) Cyanobakterium *Spirulina* ssp. (pixgood.com), (D) Mooskultur (VDI), (E) Makroalgen (lareefs.com).....7
- Abbildung 3:** Redoxpotentiale und Vorkommen des Typ I- und Typ II-Reaktionszentrums.....7
- Abbildung 4:** Darstellung der Lichtsammelmechanismen und deren Lokalisation in verschiedenen phototrophen Organismen [17], (A) Mikroalgen (Thylakoidmembran der Chloroplasten), (B) Nicht-Schwefel Purpurbakterien (bakterielle Thylakoide = Einstülpungen der Zytoplasmamembran), (C) Cyanobakterien (Faltungen der Zellmembran). Illustriert sind die wichtigsten Prozesse: Lichtsammlung (blau), Elektronentransport (gepunktete Pfeile), Protonentransport (rot-gepunktete Pfeile), biochemische Reaktionen und Transportprozesse (schwarze Pfeile).....10
- Abbildung 5:** Übersicht über Photobioreaktorsysteme im Screening-(psi.cz), Labor- (biotechnologie.de) und Produktionsmaßstab (nationalalgaeassociation.com).....11
- Abbildung 6:** AlgaeTron 230 Schüttelkultivierungssystem für phototrophe Organismen von Photon Systems Instruments (psi.cz).....12
- Abbildung 7:** Photobioreaktorsysteme (PBR) im Labormaßstab, (A) Applikon PBR (applikon-bio.com), (B) DASGIP ® PBR (eppendorf.de), (C) Lafors Lux 5 (infors-hat.com), (D) Subitec FPA PBR (subitec.com), (E) xcubio PBR (bbi-biotech.com).....14
- Abbildung 8:** Photobioreaktorsysteme im Produktionsmaßstab, (A) IGV Biotech Röhrenreaktorsystem (algaeobserver.com), (B) Raceway-Pond Kultivierungssystem in São João do Cariri, Paraíba, Brazil zur Kultivierung von *Chlorella* ssp. (algaeindustrymagazine.com), Tannenbaumreaktor der GICON ® Unternehmensgruppe (gicon.de), (D) *Hanging Gardens* der ecoduna produktions-GmbH (derstandard.at).....15
- Abbildung 9:** Übersicht über die wichtigsten industriellen Nutzungspfade von Wasserstoff.....17
- Abbildung 10:** Prozentualer Vergleich und Auflistung konventioneller Wasserstoffherstellung gegenüber regenerativen Methoden der Wasserstoffgewinnung.....18
- Abbildung 11:** Darstellung des Nitrogenase-Enzymsystems und der beteiligten Prozesse während der photofermentativen Wasserstoffproduktion mittels Nicht-Schwefel-Purpurbakterien (PNS).....19
- Abbildung 12:** Anzucht von *R. sphaeroides* DSM158 im halogenbestrahlten temperierten Wasserbad, (A) 100 mL verschlossene und temperierte Laborflaschen unter anaeroben Bedingungen, (B) Die Platzierung erfolge auf einer Magnetrührplatte, um die Sedimentation von *R. sphaeroides* DSM158 zu verhindern.....22
- Abbildung 13:** Gerenderte Schnittdarstellung (SOLIDWORKS 2012) des in dieser Studie verwendeten Halogen-Photobioreaktors. Der selbst konzipierte Bestrahlungsring fasst 12 symmetrisch angeordnete Halogenstrahler mit einer maximalen elektrischen Gesamtleistung von 600 W. Der mechanische Leistungseintrag erfolgt über drei 6-fach Scheibentrührer.....23
- Abbildung 14:** Darstellung des Halogen-Photobioreaktors im Satzbetrieb.....23

Abbildung 15: Flussdiagramm mit den einzelnen Komponenten für den (A) Satzbetrieb bzw. (B) kontinuierlichen Betrieb des Halogen-Photobioreaktors.....	24
Abbildung 16: Kalibrierung der optischen Dichte bei 680 nm gegen die Biotrockenmassekonzentration von <i>R. sphaeroides</i> DSM158.....	28
Abbildung 17: Offline-Gasanalyse des photofermentativ hergestellten Produktgases, welches sich aufgrund der stöchiometrischen Voraussetzungen aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zusammensetzt. Die Spurengase Helium und Luft sind Artefakte des Spülvorganges zu Beginn der Kultivierung und der Probenahme.....	29
Abbildung 18: ZEMAX optisches Ray Tracing zur optischen Charakterisierung des Halogen-Photobioreaktors. (A) Implementierung der Strahlergeometrie in ZEMAX, (B) Simulation des Strahlenverlaufs ausgehend vom parabolischen Reflektor des Halogenstrahlers, (C) Simulation des Photobioreaktor-Setups; dargestellt sind 8 Strahlen pro simulierten Filament, (D) Visualisierung des 64-eckigen virtuellen Detektors (gestreift) an der Innenseite des Reaktorgefäßes [62].....	31
Abbildung 19: Aufnahme experimenteller Daten für die Bestimmung der empirischen ϵ_m, K_c, K_l . (A) Messanordnung, (B) CAD-Darstellung der Messkammer, (C) Schwarze Punkte entsprechen experimentellen Messpunkten und der Flächenplot der gefitteten Funktion [62].....	33
Abbildung 20: Aufbau des simulierten Rührkesselreaktors in COMSOL Multiphysics, (A) reale Reaktorgeometrie mit Einbauten, (B) vereinfachte Reaktorgeometrie mit flachem Boden und Vernachlässigung der Einbauten, (C) Darstellung der gewählten Netzstruktur....	35
Abbildung 21: Vergleich des Emissionsspektrums der verwendeten Halogenstrahler (Kreise) mit dem Ganzzellabsorptionsspektrum von <i>R. sphaeroides</i> DSM158 (Kreuze). Die Peaks bei 800 nm und 870 nm entsprechen der Absorption des Bakterienchlorophylls a (BChl a). Die Absorption der intrazellulären Carotinoide verursachen Peaks im Wellenlängenbereich von 400 nm - 600 nm.....	36
Abbildung 22: Photofermentation mit <i>R. sphaeroides</i> DSM158 im Satzbetrieb unter verschiedenen Bedingungen (siehe Legende). (A) Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} [$mL L^{-1} h^{-1}$], (B) kumulative Wasserstoffproduktion [mL] über den Kultivierungsverlauf von 48 h. Die eingesetzten Abbildungen zeigen die Ganzzellabsorptionsspektren von <i>R. sphaeroides</i> DSM158 zum Zeitpunkt der Inokulation und nach 24 h Kultivierungsdauer [55]..	38
Abbildung 23: Konturplot des Einflusses der Prozessparameter Bestrahlungsstärke (I_0) und volumetrischem Leistungseintrag (P_0/V_L) auf die maximale Wasserstoffproduktionsrate ($r_{H_2,max}$) während der photofermentativen Wasserstoffproduktion im Satzbetrieb. Die gekennzeichneten Nummerierungen 1-3 im Konturplot entsprechen den Bedingungen, die anhand von Abbildung 22 im Detail betrachtet wurden. Kennzeichnung 4 entspricht dem Optimum für $r_{H_2,max}$ innerhalb dieser Prozessoptimierung. Pfeil 1 betrachtet den qualitativen Einfluss eines variierenden P_0/V_L bei fixiertem I_0 , Pfeil 2 stellt die Erhöhung von I_0 bei konstantem P_0/V_L dar [55].....	40
Abbildung 24: Photofermentation mit <i>R. sphaeroides</i> DSM158 im Satzbetrieb unter optimierten Bedingungen ($P_0/V_L = 0,55 kW m^{-3}$ und $I_0 = 2250 W m^{-2}$), (A) Verlauf der Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}), pH, C:N Verhältnis; (B) Biotrockenmassekonz. (BTM), Milchsäurekonz. (MS), Glutaminsäurekonz. (GS) und kumulative Wasserstoffproduktion [55].....	41
Abbildung 25: Darstellung von Prozessgrößen beim Übergang vom Satzbetrieb (0 h - 18 h) in eine kontinuierliche Prozessführung (18 h-180 h) bei einer Durchflussrate D von $0,096 h^{-1}$. (A) Biotrockenmassekonzentration (BTM), Milchsäurekonz. (MS), Glutaminsäurekonz.(GS); (B) Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}), kumulative Wasserstoffproduktion und Druck [55].....	46

- Abbildung 26:** (A) X-D-Diagramm für die Fließgleichgewichtsbedingungen der photofermentativen Wasserstoffproduktion für Durchflussraten D von $0,024 \text{ h}^{-1}$ - $0,24 \text{ h}^{-1}$. Das Diagramm beinhaltet die Biotrockenmassekonz. (BTM), die Substrate Milch- (MS) und Glutaminsäure (GS) sowie die Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}); die Punkt-Strich-Linie kennzeichnet die kontinuierlichen Prozessbedingungen ($D = 0,096 \text{ h}^{-1}$) mit dem höchsten r_{H_2} (B) Darstellung der biomassebezogenen Produktivität und des C:N-Verhältnisses im Fließgleichgewicht.....47
- Abbildung 27:** Einfluss der Rührer-Reynolds-Zahl Re_R auf das Fließgleichgewicht der Biotrockenmassekonz. (BTM) und Wasserstoffproduktionsrate (r_{H_2}) bei einer konstanten Durchflussrate D von $0,096 \text{ h}^{-1}$. Die gestrichelte Linie illustriert den Übergang vom laminaren in den turbulenten Strömungsbereich unter der Annahme einer kritischen Rührer-Reynolds-Zahl von 10^4 . Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert über 24 h Fließgleichgewicht [62].....49
- Abbildung 28:** (A) ZEMAX simulierte Strahlungsintensitätsverteilung am virtuellen Detektor nach Passage der transparenten Bioreaktorwand; (B) Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Intensitätswerte bei einer Bioreaktorhöhe von 80 mm.....50
- Abbildung 29:** Simulierte steady-state Verteilung der Strahlungsintensität im zylindrischen Bioreaktorgefäß für Biotrockenmassekonzentrationen von (A) $0,05 \text{ g L}^{-1}$ und (b) $2,0 \text{ g L}^{-1}$ [62].....52
- Abbildung 30:** CFD-Simulation (COMSOL Multiphysics) der Strömungsprofile, Fluidgeschwindigkeiten und -orientierungen induziert durch variierende Rührerdrehzahlen (drei 6-fach Scheibenrührer mit 150 rpm, 300 rpm, 600 rpm und 750 rpm) [62].....55
- Abbildung 31:** Targets für die durchflusszytometrische Analyse von Mikroorganismen, verändert nach Diaz et al. (2010) [105].....60
- Abbildung 32:** Kultivierung immobilisierter und suspendierter Mikroalgenkulturen in 300 mL Schüttelkolben (Schott, Duran, Wertheim, Deutschland). Die Beleuchtung erfolgte über warmweiße LED Panels, welche die schüttelnden Kolben seitlich beleuchteten.....63
- Abbildung 33:** (A) BioScaffolder 2.1 (Bildquelle: Anja Lode, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung); (B) Funktionsprinzip des 3D-Bioprintings: das zellbeladene Hydrogelmaterial wird über Druckluft durch eine Dosierspritze gedrückt und die Struktur schichtweise aufgebaut (Bildquelle: Anja Lode, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung).....65
- Abbildung 34:** Kalibriergeraden für die Berechnung der Zellkonzentration aus dem extrahierten Chlorophyll. *C. reinhardtii* 11.32b ($R^2 = 0,9997$) und *C. sorokiniana* UTEX1230 ($R^2 = 0,9996$).....66
- Abbildung 35:** Viabilitätsbestimmung von in Hydrogelen eingebetteten Mikroalgenkulturen. (A) Roter Fluoreszenzkanal = Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls (lebende Zellen); (B) SYTOX Green gefärbte Zellen (tote Zellen); (C) Ausschnitt aus Teilbild A; (D) Ausschnitt aus Teilbild B [118].....67
- Abbildung 36:** (Oben) Makro- und mikroskopische Bestimmung des Wachstums von *C. reinhardtii* 11.32b in 3D-geplotteten Hydrogelen über einen Versuchszeitraum von 12 Tagen unter photoautotrophen Bedingungen ($26 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 rpm, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (Unten) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Ermittlung der Viabilität der eingebetteten Mikroalgen, SYTOX Green (525/10 nm)-Totfärbung, Chlorophyllautofluoreszenz (605/15 nm) für die Gesamtzellzahl und die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle [119].....69
- Abbildung 37:** (A) Untersuchung der autofluoreszenten Signale im grünen und roten Spektralbereich (Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61, Biotec Dresden, Anregung: 480/20 nm); (B)

Gatingstrategie zur Separation der Mikroalgenzellen durch Nutzung der Chlorophyllfluoreszenz und des Vorwärtsstreulichtes (FSC).....	70
Abbildung 38: Filterkonfiguration im Cube8 Durchflusszytometer zur Detektion der Fluoreszenzsignale: FL1: 520/20, FL2: 590/50, FL3: 675/50. Der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC ₄ (3) wird sowohl im FL1- als auch im FL2-Kanal detektiert. Die Autofluoreszenz des intrazellulären Chlorophylls wird im FL-3 Kanal detektiert.....	71
Abbildung 39: (A) Zeitlicher Viabilitätsverlauf (= Zellen mit aktivem Membranpotential) einer <i>C. reinhardtii</i> 11.32b und hitzetoleranten <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230 Population während der Inkubation bei 50 °C. (B) Subpopulationen der <i>C. reinhardtii</i> 11.32b Population mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften; Zellen mit schwacher grünen Autofluoreszenz (1. Quadrant), Zellen mit verstärkter grünen Fluoreszenz hervorgerufen durch eine depolarisierte Zellmembran und das Eindringen und Binden des Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC ₄ (3) an intrazelluläre Proteine und Membranen [118].....	73
Abbildung 40: Untersuchung des Temperatureinflusses und der Beleuchtungsbedingungen auf das Biomassewachstum und die Viabilität von <i>C. reinhardtii</i> 11.32b und <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230 Suspensionskulturen. (A) T = 26 °C, 150 µmol m ⁻² s ⁻¹ , kontinuierliche (24/0) oder zyklische Beleuchtung (14/10); (B) T = 30 °C, 150 µmol m ⁻² s ⁻¹ , kontinuierliche (24/0) oder zyklische Beleuchtung (14/10); (C) T = 37 °C, 150 µmol m ⁻² s ⁻¹ , kontinuierliche (24/0) oder zyklische Beleuchtung (14/10). Die Daten stellen den Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten dar [118].....	75
Abbildung 41: Anzahl der Zellen mit aktiver polarisierter Zellmembran nach 144 h Kultivierung unter photoautotrophen Bedingungen. Die Daten wurden durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC ₄ (3) und anschließender durchflusszytometrischer Analyse erhalten; (A) <i>C. reinhardtii</i> 11.32b und (B) <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230. Die Daten stellen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung [118].....	77
Abbildung 42: Darstellung eines mikroalgenbeladenen Hydrogels. Die Bildung der photosynthetisch aktiven Zellcluster in der Matrixumgebung ist auf makroskopischer Ebene sichtbar (Fotos: Sophie Brüggemeier, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenks- und Weichgewebeforschung).....	80
Abbildung 43: Vergleichende Darstellung der erzielten Wachstumsraten [d ⁻¹] von Suspensionskulturen (schwarze Balken) und Hydrogel-eingebetteten Mikroalgenkulturen (rote Balken) in Abhängigkeit der Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen (A) <i>C. reinhardtii</i> 11.32b und (B) <i>C. sorokiniana</i> UTEX1230 [118].....	80
Abbildung 44: Co-Kultivierung von Mikroalgen und humanen SaOS-2 Zellen in einem strukturierten Hydrogel, oben: CAD-Modell der Strangaufteilung von Mikroalgen (grün) und humanen Zellen (violett); unten: Visualisierung der beiden Zelltypen mittels cLSM, Mikroalgen werden über die Fluoreszenz des Chlorophylls visualisiert (rot), SaOS-2 Zellen wurden mit Calcein angefärbt. (Fotos: Sophie Brüggemeier, Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenks- und Weichgewebeforschung) [119].....	85
Abbildung 45: Anwendung von Leuchtstoffröhren und Licht emittierenden Dioden (LEDs) in Photobioreaktoren verschiedener Maßstäbe.....	87
Abbildung 46: Schematischer Aufbau einer einschichtigen organischen Leuchtdiode. S ₀ und S ₁ kennzeichnen den Grund- und Anregungszustand des Emittiermaterials; hv bezeichnet die emittierten Photonen im sichtbaren Spektralbereich.....	88
Abbildung 47: Organische Leuchtdioden (OLEDs) können in beliebiger Geometrie hergestellt werden (links, Bildquelle: Philipps Lumiblade OLEDs, architonic.com). Durch die Verwendung flexibler Substratmaterialien sind auch flexible Lichtquellen möglich (rechts, Bildquelle: schott.com).....	89

Abbildung 48: Darstellung des 3DP-Druckvorgangs (Bildquelle: 3d-solutions.at). Die Nummerierungen sind im Text erläutert.....	90
Abbildung 49: Funktionsprinzip des Selektiven Lasersinterns (Quelle: eos.info).....	91
Abbildung 50: Anforderungskatalog an das miniaturisierte OLED-basierte Laborkultivierungssystem (MicroLED-Bioreaktor).....	93
Abbildung 51: Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>C. reinhardtii</i> 11.32b. Die roten Punkte kennzeichnen den Rhodopsin-enhaltenden Augenfleck.....	94
Abbildung 52: Miniaturisierter Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktor; FPA-Kultivierungskammer mit Fuß- und Deckelteil (oben links); FPA-Kultivierungskammer mit Faser- und Sensorikhalterung (rot, oben rechts); integrierte Elektronik zur Ansteuerung der OLED-Module (unten links) und der optischen Sensorik (unten rechts).....	96
Abbildung 53: Visualisierung des internen Airlift-Prinzips in der FPA-Kultivierungskammer: Die Gasblasen steigen im Riser (rechte Seite der Kammer) auf und verursachen die Zirkulation der Flüssigphase um den Spacer. Im Downcomer (linke Seite der Kammer) treten keine Blaseninterferenzen während der optischen Messung der Zelldichte und Chlorophyllfluoreszenz auf.....	97
Abbildung 54: (A) Unterteilung der Kultivierung in Beleuchtungs- und Messphasen; während der optischen Messungen werden die OLED-Module ausgeschaltet, um Interferenzen an den RGB-Sensoren zu vermeiden. (B) Abhängigkeit der Temperatur des Kulturmediums von der Inkubatortemperatur.....	97
Abbildung 55: Integration der optischen Sensorspots für die Suspensionsparameter pH, dCO ₂ und dO ₂ in die FPA-Kultivierungskammer.....	99
Abbildung 56: Prozessleitsoftware OLEmibi zur Definition der Prozessparameter und Visualisierung des Bioprozesses.....	99
Abbildung 57: Ermittlung des volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten $k_{L,a}$ [h ⁻¹] in der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer mit Hilfe der integrierten optischen Sensorspots bei verschiedenen Begasungsraten.....	102
Abbildung 58: Vergleich der spektralen Eigenschaften einer warmweißen LED-Lichtquelle (gepunktete Linie) mit den OLED T37 Modulen (durchgezogene Linie). Der hinterlegte Bereich entspricht dem Ganzzellabsorptionsspektrum der Mikroalge <i>C. reinhardtii</i> 11.32b wobei lichtabsorbierende Spektralbereiche der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) hervorgehoben wurden (Punkt-Strich-Linie).....	103
Abbildung 59: Photonenflussdichte PFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] der OLED T37 Module in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.....	105
Abbildung 60: Simulierte Profile der Photonenflussdichte PFD über den Querschnitt der FPA-Kultivierungskammer bei (A) einseitiger Beleuchtung (gepunktete Linie, $I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, BTM = 1,0 g L ⁻¹) und zweiseitiger Beleuchtung (durchgezogene Linie, $I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, BTM = 1,0 g L ⁻¹) bzw. (B) zweiseitiger Beleuchtung ($I_0 = 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und variierenden BTM (0,05 g L ⁻¹ - 1,0 g L ⁻¹).....	105
Abbildung 61: Ermittlung der hydrodynamischen Parameter der FPA-Kultivierungskammer; (A) volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient $k_{L,a}$ [h ⁻¹] und Mischzeit t_m [s] in Abhängigkeit der Begasungsrate; (B) Verdunstungsrate [%vol pro Tag], und Gas hold-up ϵ_G [-] in Abhängigkeit der Begasungsrate.....	107
Abbildung 62: Vergleichende Messung der Prozessparameter dO ₂ und pH im (A) Riser und (B) Downcomer der FPA-Kultivierungskammer bei verschiedenen Konzentrationen an CO ₂ in der Begasung und einer Begasungsrate von 0,5 L h ⁻¹	110

- Abbildung 63:** Echtzeit-Analyse der Zellkonzentration und Chlorophyllfluoreszenz bzw. der Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH während des photomixotrophen Wachstums (TAP-Medium) von *C. reinhardtii* 11.32b im MicrOLED-Bioreaktor unter (A) kontinuierlicher OLED-Beleuchtung und (B) Hell-/Dunkelzyklen von 12/12 h; Kultivierungsparameter: $I_0 = 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,1 vol% CO_2 in wassergesättigter Luft, Begasungsrate: $0,5 \text{ L h}^{-1}$, Temperatur: $26 \text{ }^\circ\text{C}$113
- Abbildung 64:** Variation des CO_2 -Anteiles in der Begasung ($0,5 \text{ L h}^{-1}$) während der repeated-batch Kultivierung von *C. reinhardtii* 11.32b unter photoautotrophen Bedingungen (HS-Medium), (A) Echtzeit-Biotrockenmasse und Chlorophyllfluoreszenz, (B) Suspensionsparameter dO_2 , dCO_2 und pH in Abhängigkeit des CO_2 -Gehaltes. Kultivierungsparameter: $I_0 = 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatur: $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur ein Versuchsdurchlauf dargestellt.....116

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Übersicht über die zurzeit wichtigsten Produkte phototropher Organismen und deren Marktpotential, erweitert aus [3].....2
- Tabelle 2:** Übersicht mikrobieller Photosynthesepigmente, deren zelluläre Lokalisation und Absorptionsbereiche.....6
- Tabelle 3:** Übersicht über die Ergebnisse, die für die Variation des volumetrischen Leistungseintrages (P_0/V_L) und der mittleren Bestrahlungsintensität (I_0) hinsichtlich der photofermentativ gebildeten *R. sphaeroides* DSM158 Biotrockenmassekonzentration [g L^{-1}], der Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} und der kumulativen Wasserstoffproduktion [mL_{H_2}] im Satzbetrieb erzielt wurden. Die grau hinterlegten Prozessbedingungen stellen die optimierten Parameter dar.....39
- Tabelle 4:** Überblick über die photofermentative Wasserstoffproduktion mit verschiedenen *R. sphaeroides* Stämmen und Prozessbedingungen.....43
- Tabelle 5:** Viabilität von Mikroalgen Suspensions- und Hydrogel-immobilisierten Kulturen (3D-Bioprinting-Prozess) unter variierenden Temperatur ($26 \text{ }^\circ\text{C}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) und Beleuchtungsbedingungen ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kontinuierliche Beleuchtung 24/0 h oder Hell-/Dunkelzyklen von 14/10 h) nach 144 h Kultivierung.....82
- Tabelle 6:** Vergleichende Übersicht über Lichttechnologien mit ihrer Effizienz und Lebensdauer [141].....86
- Tabelle 7:** Vergleich des prozentualen Anteils an photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) von LED und OLED-Lichtquelle.....104
- Tabelle 8:** Vergleich der hydrodynamischen Parameter verschiedener Maßstäbe von FPA-PBRs.....109
- Tabelle 9:** Biotrockenmasse-Produktivität, max. Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Flüssigphase in Abhängigkeit des CO_2 -Anteiles in der Begasung. Die Werte repräsentieren den Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.....117

Thesen zur Dissertation

„Entwicklung und Evaluierung neuer Bioreaktorkonzepte für phototrophe Mikroorganismen“

Die Photobiotechnologie hat ein großes Potential für die Entwicklung nachhaltiger Energie- und Syntheseprozesse. Der Bedarf an Produkten der biogenen Wertschöpfung umfasst vor allem nachhaltige erzeugte Energien und pharmazeutische Wirkstoffe. Trotz des großen Potentials von geschätzten 500.000 Algenspezies werden zurzeit lediglich 15 Mikro- und 220 Makroalgen technisch genutzt. Dieser Umstand ist u.a. dem geringen Prozessverständnis und den spezifischen Anforderungen der photobiotechnologischen Prozesse an die technischen Systeme zur Kultivierung dieser Organismen geschuldet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von Kultivierungssystemen für das Nichtschwefelpurpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158 und die Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* 11.32b und *Chlorella sorokiniana* UTEX1230. Dafür wurden moderne Methoden, u.a. computergestützte Simulationstechniken, Additive Fertigungsverfahren, organische Leuchtdioden und optische nichtinvasive Prozessüberwachung gewinnbringend miteinander kombiniert.

I. Kapitel: Prozessentwicklung zur photofermentativen Wasserstoffproduktion mit *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158

1. Im Satzbetrieb hat die Bestrahlungsstärke einen größeren Einfluss auf die photofermentativ erzielte Wasserstoffproduktionsrate r_{H_2} als der mechanische Leistungseintrag.
2. Im Satzbetrieb erzielt *R. sphaeroides* DSM158 im Halogen-Photobioreaktor (PBR) bei einer Bestrahlungsstärke von 2250 W m^{-2} und einem P_0/V_L von $0,55 \text{ kW m}^{-3}$ eine r_{H_2} von $195 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
3. Ein C:N (Milchsäure:Glutaminsäure)-Verhältnis von $22,5 \pm 6,3$ zeigte ($D = 0,096 \text{ h}^{-1}$) optimale Bedingungen für eine kontinuierliche Wasserstoffproduktion.
4. Im kontinuierlichen Betrieb nimmt r_{H_2} mit steigender Rührerdrehzahl im turbulenten Strömungsbereich ab.
5. Optische *Ray Tracing*- und Strömungssimulationen (CFD) können für die Charakterisierung von Lichtzonen und der Fluideigenschaften in Photobioreaktoren genutzt werden.

II. Kapitel: *Green Bioprinting* - Mikroalgenkultivierung und Biomonitoring in 3D-geplotteten Hydrogelen

1. Die Viabilität von Mikroalgenpopulationen in Suspension kann anhand der Polarität der Zellmembran und dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₃(4) über durchflusszytometrische Analyse sensitiv detektiert werden.

2. Unter photoautotrophen Bedingungen zeigt die Populationsviabilität und die Wachstumsraten von *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 Suspensionskulturen eine starke Abhängigkeit von der Temperatur und den Beleuchtungszyklen.
3. *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 lassen sich durch ein 3D-Bioprinting-Verfahren homogen in eine Hydrogelmatrix einbetten. 24 h nach dem Extrusionsprozess zeigen die Algenzellen eine hohe Viabilität.
4. Unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen bilden sich in der Hydrogelmatrix photosynthetisch aktive Zellcluster mit hoher Vitalität aus.
5. In der Hydrogelumgebung erzielten *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 stabile Wachstumsraten von 0,4 - 0,6 d⁻¹ bzw. 0,5 - 0,7 d⁻¹ unabhängig von der eingestellten Temperatur und Beleuchtungszyklen.
6. Die Viabilität eingebetteter *C. reinhardtii* 11.32b und *C. sorokiniana* UTEX1230 Kulturen lässt sich unter Nutzung der Eigenfluoreszenz des Chlorophylls, einem nicht-membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff und Fiji-basierter Bildanalyse ermitteln.

III. Kapitel: Entwicklung eines miniaturisierten Laborkultivierungssystems für Mikroalgen mit optischem Prozessmonitoring (MicroLED-Bioreaktor)

1. Der MicroLED-Bioreaktor wurde als miniaturisierter Flat-Panel-Airlift-(FPA) Reaktor (V=15 mL) ausgelegt und ermöglicht die optische nichtinvasive Überwachung der Zelldichte, Chlorophyllfluoreszenz, dem dO₂, dCO₂ und dem pH-Wert.
2. Die komplexen Reaktorkomponenten wurden mittels Selektiven Lasersintern aus Polyamid hergestellt.
3. Organische Leuchtdioden sind aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften für die Anregung von Photosynthesepigmenten geeignet. Weiße OLEDs erreichen eine PAR-Effizienz von 35,31 %.
4. Ein weißes OLED-Modul erzielte eine maximale Photonenflussdichte (PFD) von 83 μmol m⁻² s⁻¹; durch zweiseitige Beleuchtung kann in der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer eine PFD von 151 μmol m⁻² s⁻¹ erzielt werden.
5. Die hydrodynamischen Parameter (Mischzeit, Sauerstofftransferkoeffizient, Gas hold-up) der miniaturisierten FPA-Kultivierungskammer im MicroLED-Bioreaktor sind für eine Begasungsrate von bis zu 1,0 L h⁻¹ vergleichbar mit Labor- und Produktions-FPA-Bioreaktoren.
6. Für Begasungsraten > 1,0 L h⁻¹ sind zusätzliche Maßnahmen gegen die steigende Verdunstungsrate erforderlich.
7. Die optische Sensorik des MicroLED-Bioreaktors identifiziert Stoffwechselforgänge von Mikroalgen und erlaubt die Bioprozessentwicklung im miniaturisierten Maßstab.

Verzeichnis eigener Veröffentlichungen:

Teile dieser Arbeit wurden in Form von Artikeln in wissenschaftlichen Zeitschriften oder als Konferenzbeitrag (Poster und/oder Vortrag) veröffentlicht.

Liste eigener Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften:

Krujatz F, Herold F, Bley T, Steingroewer J (2017) Process model for heterotrophic growing *Chlorella zofingensis*. *Algal Research*, in preparation.

Krujatz F, Seidel J, Lode A, Bley T, Gelinsky M, Steingroewer J (2017) Additive Biotech - Chances, challenges and recent examples of using additive technologies for biotechnological applications. *New Biotechnology*, invited review, submitted.

Krujatz F, Hild O, Jahnel M, Fehse K, Werner A, Bley T (2016) Exploiting the potential of OLED-based photo-organic sensors for biotechnological applications. *Chemical Sciences Journal*, 7:134.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Schurig C, Gommel C, Lindner F, Bley T, Steingroewer J (2016) MicroLED-photobioreactor: Design and characterization of a milliliter-scale Flat-Panel-Airlift-Photobioreactor with optical process monitoring. *Algal Research*, 18, 225-234.

Jahnel M, Beyer B, Thomschke M, Fehse K, **Krujatz F**, Leo K (2015) Narrow bandwidth top-emitting OLEDs designed for Rhodamine 6G excitation in biological sensing applications, *Electronics*, 4, 982-994.

Lode A, **Krujatz F**, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, Weber J, Bley T, Gelinsky M (2015) Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications. *Engineering in Life Sciences*, 15, 177-183.

Krujatz F, Lode A, Brüggemeier S, Schütz K, Kramer J, Bley T, Gelinsky M, Weber J (2015) Green bioprinting: Viability and growth analysis of microalgae immobilized in 3D-plotted hydrogels versus suspension cultures. *Engineering in Life Sciences*, 15, 678-688.

Krujatz F, Illing R, Krautwer T, Liao J, Helbig K, Goy K, Opitz J, Cuniberti G, Bley T, Weber J (2015) Light-field-characterization in a continuous hydrogen-producing photobioreactor by optical simulation and computational fluid dynamics. *Biotechnology and Bioengineering*, 112, 2439-2449.

- **Krujatz F** et al. (2015) Enhanced bioprocess understanding via (optical) simulation tools. *Biotechnology and Bioengineering*, Spotlight Feature, 2439.
- **Krujatz F**, Helbig K (2015) Gaining insight into biological hydrogen production by computational approaches. *Atlas of Science*.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J. Rapid Prototyping meets Bioreactor—a novel small-scale organic light emitting diode based photobioreactor with integrated sensor systems. *New Biotechnology*. 2014;31, Supplement:S124.

Helbig K, Hellwig R, **Krujatz F**, Bley T, Weber J (2014) Continuous photofermentative production of bio-hydrogen with *Rhodobacter sphaeroides* DSM158. *New Biotechnology*. 31, Supplement:S117.

Weber J, **Krujatz F**, Hilpmann G, Grützner S, Herrmann J, Thierfelder S, Bienert G, Illing R, Helbig K, Hurtado A, Cuniberti G, Mertig M, Lange R, Günther E, Opitz J, Lippmann W, Bley T, Haufe N (2014) Biotechnological hydrogen production by photosynthesis. *Engineering in Life Sciences*, 00, 1-15.

Weber J, Helbig K, Hewllig R, **Krujatz F**, Bley T (2014) Continuous Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158. *Chemie Ingenieur Technik*. 86,1408.

Krujatz F, Härtel P, Helbig K, Haufe N, Thierfelder S, Bley T, Weber T (2014) Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* DSM158 under intense irradiation. *Bioresource Technology*, 175, 82-90.

Haufe N, **Krujatz F**, Weber J, Grützner S, Schelter M, Zosel J, Mertig M (2013) Biogene Wasserstoffproduktion und deren Analytik. 11. *Dresdner Sensor-Symposium, Inproceedings* S. 422-423. DOI 10.5162/11dss2013/L6

Krujatz F, Haarstrick A, Nörtemann B, Greis T (2012) Assessing the toxic effects of nickel, cadmium and EDTA on growth of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas brassicacearum*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 1-13.

Patentanmeldungen

Reaktorsystem zur Mikroorganismen-Kultivierung und deren Anwendung für biochemische Photosynthese-Prozesse, Deutsche Patentanmeldung, Zeichen: 5.3.2-4337.20/A 3964/TUD107

Konferenzvorträge:

Seidel J, **Krujatz F**, Steingroewer J, Bley T, Gelinsky M, Lode A (2016) Green Bioprinting – a promising method for embedding plant cells in a structured hydrogel matrix, *Bio-Tech16*, Wädenswil.

Krujatz F, Lode A, Gelinsky M, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Steingroewer J (2016) Exploiting the potential of additive technologies for advanced microcultivation solutions for microalgae and plant cells, 17th *European Congress on Biotechnology*, Krakau.

Krujatz F, Lode A, Gelinsky M, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Steingroewer J (2016) Individual BioTech – Chances, challenges and recent examples of using additive technologies in bio-process engineering, *New Frontiers for Biotech-Processes*, Koblenz.

Socher ML, **Krujatz F**, Bley T, Weber J, Steingroewer J, Löser C (2015) The challenge of scaling up photobioreactors – approaches in a small scale for microalgae, *Scale-up and Scale-down of bioprocesses*, Hamburg-Bergedorf.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2014) Organic semiconductors as lighting tool for phototrophic microorganisms. *Biomaterials - Made in Bioreactors*, Radebeul

Weber J, Helbig K, Hewllig R, **Krujatz F**, Bley T (2014) Continuous Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides* DSM158. *Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, 86, 1408.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2014) Organic Light for Organic Production - A novel small-scale OLED-based photobioreactor. *BioTech 2014 and 6th Czech – Swiss Symposium with Exhibition*, Prag (Poster und Vortrag).

Posterbeiträge bei nationalen und internationalen Konferenzen:

Helbig K, **Krujatz F**, Fehse K, Jahnel M, Gommel C, Schurig C, Lindner F, Bley T, Weber J (2015) MicroLED-Bioreactor: A millilitre-scale photobioreactor with OLED-lighting and optical process monitoring. *3rd European Congress of Applied Biotechnology*, Nizza.

Krujatz F, Steingroewer J, Lode A, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, Bley T, Gelinsky M, Weber J (2015) 3D-Bioprinting of microalgae within hydrogel structures allows investigation of cell-cell interactions and improves autotrophic cultivation. *3rd European Congress of Applied Biotechnology*, Nizza.

Krujatz F, **Helbig K**, Lode A, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, Bley T, Gelinsky M, Weber J (2015) Green Bioprinting – Immobilisierung von Mikroalgen in 3D-Hydrogelen für biotechnologische und medizinische Anwendungen. *7. Bundesalgenstammtisch*, Garching.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2015) Algenbiotechnologie – Quelle für nachhaltige Bioprozesse. *Biotech meets Politics*. Dresden.

Lode A, **Krujatz F**, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, Bley T, Weber J, Gelinsky M (2014) Microalgae immobilization and growth in 3D-plotted hydrogels. *Biomaterials - Made in Bioreactors*, Radebeul (**Posterpreis**).

Lenk F, **Socher ML**, Schott C, Winkler K, Lenk F, **Krujatz F**, Stange R, Weber J, Bley T, Steingroewer J (2014) Photobioreactors for any purpose - from screening to lab-scale. *Biomaterials - Made in Bioreactors*, Radebeul (**Posterpreis**).

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2014) *Rapid Prototyping* meets *Organic Light* - Phototrophe Kultivierung im Screeningmaßstab. *7. Bundesalgenstammtisch*, Köthen.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2014) Organic Light for Organic Production - A novel small-scale OLED-based photobioreactor. *BioTech 2014 and 6th Czech – Swiss Symposium with Exhibition, Prag (Posterpreis)*.

Krujatz F, Fehse K, Jahnel M, Bley T, Weber J (2014) Rapid Prototyping meets Bioreactor - a novel small-scale organic light emitting diode based photobioreactor with integrated sensor systems. *16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh*.

Helbig K, Hellwig R, **Krujatz F**, Bley T, Weber J (2014) Continuous photofermentative production of bio-hydrogen with *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158. *16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh*.

Krujatz F, Bley T, Weber J (2014) Enhanced viability of microalgal populations by photoperiodic cycles. *24th Annual Conference of the German Society for Cytometry, Dresden*.

Schott C, Socher ML, Winkler K, Lenk F, **Krujatz F**, Stange R, Weber J, Bley T, Steingroewer J (2014) Cultivation systems and phototrophic organisms to obtain products via economic-relevant biotechnological processes – a selection. *Bionection, Dresden*.

Krujatz F, Becher N, Haufe N, Illing R, Thierfelder S, Herrmann J, Bienert G, Grützner S, Hilpmann G, Bley T, Weber J (2013) Mikroorganismen zur Erzeugung von regenerativem Biowasserstoff. *Transferveranstaltung Biotechnologie mit der wir leben/Naturstoffe-Energie-Umwelt, Dresden*.

Krujatz F, Bechter B, Bley T, Weber J (2013) Photofermentative Produktion von Biowasserstoff mittels *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158. *Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie, Bad Wildungen (Posterpreis)*.

Socher ML, **Krujatz F**, Schmieder F, Greulich J, Weber J, Bley T (2011) Continuous phasing – a synchronization technique for recombinant yeast *Pichia pastoris*. *21st Annual Conference of the German Society for Cytometry, Bonn*.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

**„Entwicklung und Evaluierung neuer Bioreaktorkonzepte
für phototrophe Mikroorganismen“**

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten.

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bley	- Durchsicht
Dr.-Ing. Jost Weber	- Durchsicht und Korrektur

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Die Promotionsordnung der TU Dresden wird anerkannt.