

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Engineering and Design

Miniaturisierte Rührreaktoren mit LED-Beleuchtung zur photoautotrophen Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung

Philipp Wilhelm Benner

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design
der Technischen Universität München zur Erlangung eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 12.12.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Engineering and Design am 01.04.2024 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München. Ich möchte mich bei allen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zum Gelingen beigetragen haben:

Zuallererst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, der mir diese Arbeit ermöglichte und während der gesamten Zeit hervorragend betreute. Ich danke Ihnen für das entgegengebrachte Vertrauen während der eigenverantwortlichen Arbeit, hilfreiche Lösungsvorschläge und konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Thomas Brück, dem Zweitprüfer, und Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling, dem Vorsitzenden der Prüfungskommission für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Meinen ehemaligen Kommilitonen und Lehrenden, die mich während meiner akademischen Ausbildung an der Goethe-Universität Frankfurt a. M. und an der TU München begleitet und geprägt haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit, Austausch, großartige Arbeitsatmosphäre und gemeinsamen Freizeitaktivitäten.

Den Kollegen, die den Start der Promotion durch die wohlwollende Aufnahme am Lehrstuhl erleichterten: Phillip Grob, Torben Schädler, Andres Martinez, Alexander Zanker und Luis Oliveira.

Bei meinen Kollegen Nikolas von den Eichen, Lukas Bromig und Karlis Blums für die gute Zusammenarbeit und den wertvollen Austausch zum Thema Automation in der Mikroverfahrenstechnik, bei Anna-Lena Thurn und Lara Wolf für die Zusammenarbeit zum Thema Mikroalgen, Daniel Bischoff und Hannes Löwe für den Austausch beim Thema Modellierung.

Meinen Studierenden Alexander Gemmel, Roman Kalbhenn, Verena Stangl, Ruslana Romaniuk, Finn Lüdtke, Nina Beyer und José Enrique Oropeza Vargas für die Unterstützung im Labor.

Markus Amann und Nelson Vogel für die Unterstützung in technischen Belangen. Patrick Meins, Markus Amann und Marlene Schocher für die Hilfe mit allen organisatorischen Abläufen.

Anna-Lena Heins und Pauline Breitweiser für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge. Karlis Blums und Josha Herzog für das Korrekturlesen früherer Texte.

Meiner Familie und Pauline Breitwieser für den Rückhalt, Unterstützung und Teilnahme an meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Problemstellung und Zielsetzung | 3 |
| 3. | Theoretische Grundlagen | 9 |
| 3.1. | Mikroalgen | 9 |
| 3.1.1. | Photoautotropher Metabolismus..... | 10 |
| 3.1.2. | Einflussfaktoren auf das Wachstum von Mikroalgen..... | 11 |
| 3.1.3. | Produkte aus Mikroalgen..... | 15 |
| 3.2. | Photobioreaktoren im Labormaßstab | 17 |
| 3.2.1. | Anforderungen an den Photobioreaktor und unterschiedliche Bauformen | 17 |
| 3.2.2. | Miniaturisierte Bioreaktoren..... | 18 |
| 3.2.3. | Skalierbarkeit..... | 19 |
| 3.3. | Modellierung des photoautotrophen Wachstums | 20 |
| 3.3.1. | Mikroalgenkultivierung im Satzprozess | 20 |
| 3.3.2. | Lichtabschwächung im PBR..... | 22 |
| 3.3.3. | Mittlere integrale Photonenflussdichte..... | 24 |
| 3.3.4. | Wachstumskinetik..... | 25 |
| 4. | Materialien und Methoden | 29 |
| 4.1. | Konstruktive Methoden | 29 |
| 4.1.1. | Auswahl Leuchtmittel..... | 29 |
| 4.1.2. | Leiterplattenfertigung..... | 30 |
| 4.1.3. | Fertigung des Kühlkörpers | 30 |
| 4.1.4. | Filament 3D-Druck..... | 31 |
| 4.1.5. | Stromversorgung und Steuerung | 31 |
| 4.2. | Mikroalgenstämme und Reaktionsmedien..... | 31 |
| 4.3. | Vorkultur in Blasensäulenreaktoren | 32 |
| 4.4. | Kultivierung in parallelen Rührkesselbioreaktoren..... | 33 |
| 4.4.1. | Parallele Rührkesselbioreaktoren..... | 33 |
| 4.4.2. | Integration in einen Pipettierroboter und Prozesskontrolle | 33 |
| 4.4.3. | Begasung | 34 |
| 4.4.4. | Wahl von Rührorganen, Reaktionsvolumen und Rührgeschwindigkeit.. | 36 |
| 4.4.5. | Kultivierungsprotokoll | 39 |
| 4.5. | Füllstandsausgleich in parallelen Rührkesselbioreaktoren | 40 |
| 4.6. | At-line pH-Messung | 43 |
| 4.6.1. | Inkubationszeit..... | 45 |
| 4.6.2. | Langzeitstabilität..... | 46 |
| 4.7. | Kultivierung in Flachplatten PBR | 47 |
| 4.8. | At-line Messung der optischen Dichte und Korrelationen | 49 |
| 4.9. | Bestimmung der exponentiellen Wachstumsrate basierend auf OD | 49 |
| 4.10. | Messung der Lichtintensität | 50 |

| | |
|--|------------|
| 4.10.1. Eingangspotonenflussdichte I_0 | 50 |
| 4.10.2. Transmissionsmessung mit miniaturisierten Rührkessel-PBR (offline)... | 51 |
| 4.10.3. Transmissionsmessung mit Flachplatten-PBR (at-line) | 52 |
| 4.11. Biotrockenmassekonzentration | 53 |
| 4.12. Modellierung des photoautotrophen Wachstums | 53 |
| 4.12.1. Lichtabschwächungsmodelle | 53 |
| 4.12.2. Mittlere integrale Photonenflussdichte | 54 |
| 5. Gestaltung eines Beleuchtungsmoduls | 57 |
| 5.1. Leuchtmittel Auswahl | 57 |
| 5.2. Positionierung der LEDs für idealen Lichteintrag | 58 |
| 5.3. Steuerung und realisierbare Eingangspotonenflussdichten | 62 |
| 6. Photoautotrophe Satzprozesse von <i>M. salina</i> | 67 |
| 6.1. Parallele Reproduzierbarkeit | 67 |
| 6.2. pH | 73 |
| 6.3. Verdunstung | 74 |
| 6.4. Kultivierung mit Klimasimulation | 76 |
| 7. Skalierbarkeit photoautotropher Satzprozesse mit <i>M. salina</i> | 79 |
| 7.1. Photoautotrophe Satzprozesse mit <i>M. salina</i> in Flachplatten -PBR | 79 |
| 7.2. Lichtabschwächung in PBR | 81 |
| 7.3. Skalierbarkeit | 85 |
| 8. Skalierbarkeit photoautotropher Satzprozesse mit <i>S. ovalternus</i> | 91 |
| 8.1. Photoautotrophe Kultivierung von <i>S. ovalternus</i> in Flachplatten-PBR im L-Maßstab | 91 |
| 8.2. Lichtabschwächung | 92 |
| 8.3. Skalierbarkeit | 94 |
| 9. Zusammenfassung und Ausblick | 99 |
| 10. Literaturverzeichnis | 107 |
| 11. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis | 123 |
| 12. Anhang | 127 |

1. Einleitung

Der 2023 erschienene Klimawandel-Bericht des Weltklimarats (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) beschreibt einen Anstieg der globalen Oberflächentemperatur um 1,1 °C vom 19. Jahrhundert (1850 – 1900) bis heute (2011 – 2020). Die Emissionen von Treibhausgasen steigen weiter an und werden für 2019 auf 59 Gigatonnen CO₂-Äquivalenten geschätzt. Nicht nachhaltige Energie- und Landnutzung tragen wesentlich zur globalen Erwärmung bei (Calvin et al., 2023). Mikroalgen können einen Beitrag zur Lösung dieser Probleme leisten.

Mikroalgen sind einzellige Eukaryoten, die die Fähigkeit besitzen, Photosynthese zum Aufbau von Biomasse zu betreiben. Dabei nutzen sie CO₂ als Kohlenstoffquelle und Sonnenlicht als Energiequelle. Mikroalgen bieten somit großes Potential zur Kohlenstoffbindung aus der Atmosphäre, Abgasen aus Industrie und löslichen Carbonaten in Abwässern (B. Wang et al., 2008). Ebenso können Mikroalgen als Produzenten für Biokraftstoffe oder Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden (Mata et al., 2010; Schenk et al., 2008).

Dabei können Mikroalgen auch auf unfruchtbaren Flächen kultiviert werden, wodurch eine Konkurrenz um Fläche zu anderen Nahrungsmitteln vermieden wird (Hannon et al., 2010). Durch die Verwendung von Abwässern oder Salzwasser bei maritimen Mikroalgen, kann viel Trinkwasser bei der Kultivierung eingespart werden (Cantrell et al., 2008; Wijffels & Barbosa, 2010). Weiterhin besitzen sie höheren Solarenergieausbeuten als terrestrische Pflanzen (Tredici, 2010).

Mikroalgen sind keine natürliche Gruppe, sondern kommen in vielen verschiedenen Taxa vor. Je nach zählweise kommen konservative Schätzungen auf über 72.000 Arten, die verschiedenen Klassen zuzuordnen sind und entsprechend heterogen in ihren Eigenschaften auftreten (Guiry, 2012).

Methoden für die Durchmusterung der unterschiedlichen Arten sind für verschiedene Forschungsfragen relevant wie Biodieselproduktion, pharmazeutische oder agrarwirtschaftliche Anwendungen (Doan et al., 2011; Gerwick et al., 1994; Ördög et al., 2004).

Auf der Suche nach kostengünstigen, energieeffizienten und klimafreundlichen Produktionsmethoden fungiert die Biotechnologie als Brücke von der Grundlagenforschung zur Anwendung. Im Rahmen der biotechnologischen Prozessentwicklung werden optimale Produktionsbedingungen erforscht.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Um Bioprozesse mit Mikroalgen so effektiv wie möglich zu gestalten und ihren wirtschaftlichen Nutzen zu maximieren, ist es wichtig, die Kinetik des photoautotrophen Wachstums und die Produktbildung zu verstehen (Lehr et al., 2012; Yang, 1986). Photobioreaktoren (PBR) im Labormaßstab werden sowohl für physiologische Untersuchungen (Che et al., 2023) unbekannter Mikroalgenstämme verwendet, als auch für die Prozessentwicklung (Schad et al., 2023) und die Bestimmung optimaler Prozessvariablen für Wachstum und Produktbildung verwendet.

Es gibt PBR in vielen verschiedenen Bauformen mit Unterschieden in Energieeintrag, Durchmischung, Lichteintrag, Oberflächen-Volumen-Verhältnis, Grad der Automatisierung und Verfügbarkeit von Sensoren. Neben Prozessvariablen wie Temperatur, pH, gelöster Sauerstoff (engl. dissolved oxygen, DO), Salzgehalt, CO₂-Zufuhr, Energiezufuhr und Nährstoffen ist die Verfügbarkeit von Licht ein wesentlicher Faktor für photoautotrophe Bioprozesse (Koller, Löwe, et al., 2017; Koller, Wolf, et al., 2017; Pfaffinger et al., 2019). Es gibt bisher keinen Standardentwurf für einen optimalen PBR im Labormaßstab (Benner et al., 2022).

Ungeachtet der Bauformen von Bioreaktoren, müssen innerhalb der Bioverfahrenstechnik eine Vielzahl an Versuchen durchgeführt werden, um geeignete Stämme zu identifizieren und Prozessbedingungen zu definieren. Ein Ansatz dieser Fülle an unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zu begegnen, ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren. Dieses Feld der Miniaturbioreaktoren findet in der Weiterentwicklung von Medien, der Stammentwicklung oder Prozessoptimierung Anwendung (Betts & Baganz, 2006). Die Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung von Bioprosessen ist für viele Prozesse mit heterotrophen Mikroorganismen, also bei Bioprosessen mit organischen Verbindungen als Energiequelle, mittlerweile Standard. Durch weniger Verbrauch an Chemikalien, schnellerer Durchführung und deutlich gesenkten Personalkosten bei guter Skalierbarkeit wird ein rasanter Fortschritt in Forschung und Entwicklung mit diesen Mikroorganismen ermöglicht (Von den Eichen et al., 2021; Weuster-Botz et al., 2005).

Da die Gruppe der Mikroalgen viele für die Biotechnologie interessante Stämme umfasst, dabei viele Prozessvariablen erst noch bestimmt werden müssen und keine Modelle für konkrete Abschätzungen bestehen, bieten die Methoden der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung einen vielversprechenden Ansatz.

Neben Satzprozessen mit konstanter Beleuchtung werden auch Satzprozesse mit Klimasimulation durchgeführt. Kultivierungen mit Klimasimulation werden im Labormaßstab selten durchgeführt oder nur in vereinfachter Form durch Phasen von konstantem Licht und Dunkel (Hulatt et al., 2017). Dennoch sind diese Daten wichtig für jeden Prozess, der später skaliert werden soll, da für ökonomische Prozesse zumeist Sonnenlicht verwendet wird (Jonker & Faaij, 2013). Das Wachstumsverhalten von Mikroalgen kann sich von dem unter konstanter Beleuchtung zu Tag-Nacht-Simulationen unterscheiden (Pfaffinger et al., 2019).

Eine etablierte Bioreaktoreinheit (Puskeiler et al., 2005), die mit 48 parallelen Einweg-Rührkessel-Bioreaktoren im 10 mL-Maßstab arbeitet und mit einem Pipettierroboter betrieben werden kann, bietet prinzipiell eine ideale Ausgangsbasis, um auch parallele photoautotrophe Kultivierungen zu ermöglichen. Diese Bioreaktoreinheit ist in Abb. 1 dargestellt. Es können je nach Anwendung unterschiedliche Rührer-Typen magnetisch induktiv angetrieben werden. Die Suspension wird auf einen gewählten Wert temperiert und das gasdurchströmte obere Viertel der Bioreaktoren, welches Kopfraum genannt wird, gekühlt. Unterhalb der Bioreaktoreinheit befinden sich sechs parallel angeordnete Sensorriegel, die eine Bestimmung von pH und DO online und kontaktlos mittels Fluoreszenzmessungen durchführen. Die Integration in einen Pipettierroboter erlaubt die automatisierte Probenahme und Zugaben wie Zuckerlösungen, Säure oder Base zur pH-Kontrolle oder Wasser zum Verdunstungsausgleich.

Die Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung von PBR würde ein effizientes Durchmusteren von Mikroalgen-Stämmen, Medienoptimierung und eine Bioprozessentwicklung beschleunigen. Bisher gibt es nur wenige vergleichbare Ansätze: Ein Flachplatten-PBR im mL-Maßstab (Krujatz et al., 2016), ist nicht in parallelisierter Form verfügbar und ist nicht in einen Pipettierroboter integriert oder in einer anderen Art automatisiert. Ein Ansatz mit hoher Parallelisierung in Mikrotiterplatten (MTP) (Nowack et al., 2005; Ojo et al., 2015) verfügt nicht über einen individuellen Lichteintrag für einzelne Kulturen. Die wählbaren Lichtintensitäten sind limitiert und der sehr kleine Maßstab erlaubt es kaum Probe zu entnehmen. Ein Ansatz mit 16 parallelen Blasensäulenreaktoren (Havel et al., 2008) verfügt nicht über frei wählbaren Lichtintensitäten und ist nicht automatisierbar. Ein Gaslift-PBR im Reagenzglas-Maßstab (MC1000 PSI Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) (Che et al., 2023; Schad et al., 2023) ist auf 8 parallele Ansätze limitiert und ist nicht automatisiert. Keine der vorgestellten miniaturisierten PBR verfügt über die Möglichkeit eine Klimasimulation durchzuführen.

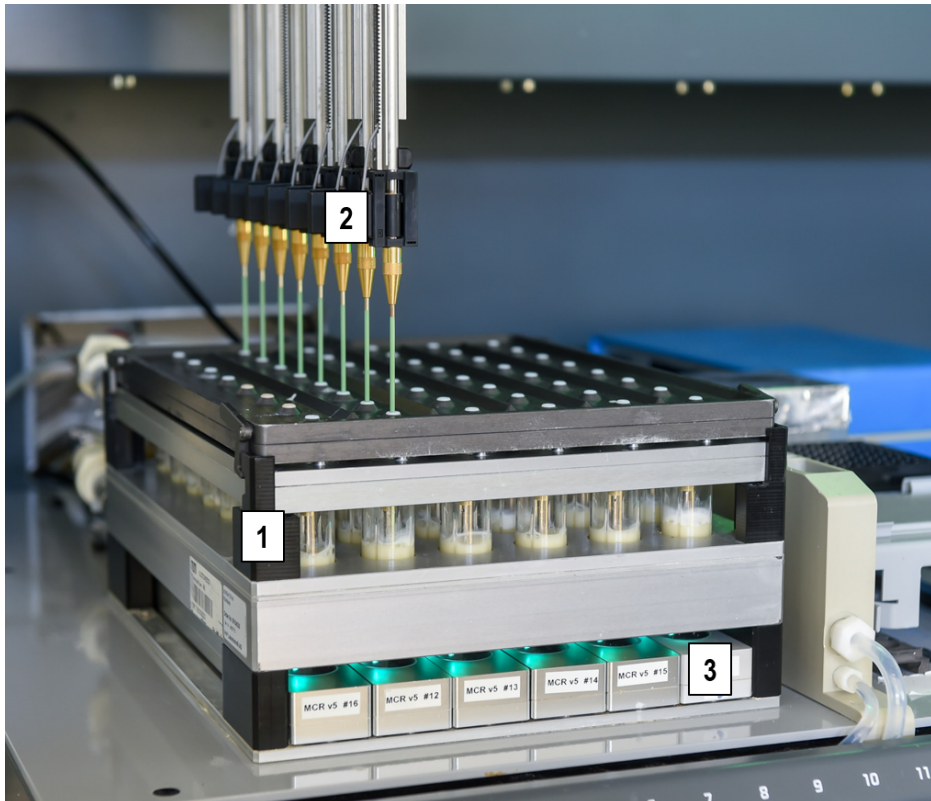


Abb. 1: Foto einer Bioreaktoreinheit zur heterotrophen Kultivierung von Mikroorganismen in 48 parallelen Rührkesselbioreaktoren im 10 mL-Maßstab. Die Bioreaktoreinheit (1) (BioREAKTOR48, 2mag AG, München, Germany) ist in einem Pipettierroboter mit acht Pipettierkanälen (2) integriert. Sensorriegel (3) befinden sich unterhalb der Bioreaktoreinheit und ermöglichen eine kontaktlose online Messung von DO und pH über Fluoreszenz.

Folglich besteht weiterhin der Bedarf an einem PBR, der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung gleichermaßen umsetzt. Bei den genannten PBR ist vor allem die Automatisierung nicht zufriedenstellend etabliert. Um dieses Problem zu lösen kann anstatt einen PBR zu automatisieren auch eine etablierte und automatisierte Bioreaktoreinheit aus der heterotrophe Bioprozessentwicklung für photoautotrophe Kultivierungen umgebaut werden.

Daraus ergibt sich die Überlegung, wie photoautotrophe Prozesse in der dargestellten Bioreaktoreinheit (Abb. 1) umgesetzt werden können. Das Ziel besteht darin einen individuellen Lichteintrag für jeden Bioreaktor zu ermöglichen. Das Beleuchtungsmodul sollte eine konstante Beleuchtungsintensität als auch die Kultivierung mit der Simulation von Tag-Nach-Verläufen ermöglichen. Dabei darf die Funktionalität, wie den Betrieb innerhalb eines Pipettierroboters, nicht beschränkt werden.

Die Bioreaktoreinheit erlaubt durch ihren Aufbau nur an wenigen Stellen die Positionierung eines Beleuchtungsmoduls. Denkbar wären ein seitlicher Lichteintrag, um das frei

zugängliche mittlere Drittel der Rührkesselreaktoren (siehe Abb. 1) oder eine Beleuchtung des Reaktorbodens. Letztere würde einen Verzicht auf die Sensorriegel zur Folge haben. Die Messung des pH könnte alternativ zur online Messung mittels Sensorriegel auch at-line über eine Fluoreszenzmessung in MTP erfolgen (Knorr et al., 2007).

Es muss sichergestellt werden, dass der Lichteintrag möglichst homogen auf den einzelnen Reaktor trifft und die 48 parallelen Reaktorpositionen gleichwertig beleuchtet werden. Dabei ist auch die genaue Positionierung der Lichtquelle wichtig. Während des Eintrags hoher Bestrahlungsintensitäten wird viel Wärme entstehen, welche abtransportiert werden muss. Ein geeigneter Kühlkörper muss in der Konzeption eines Beleuchtungsmoduls daher mit aufgenommen werden (Glemser et al., 2016). Die 48-fach parallele Bioreaktoreinheit verfügt über einen einzelnen Gasanschluss und die Prozessluft verteilt sich im Deckel auf alle 48 Reaktorpositionen. Eine Versorgung der Kulturen mit CO₂ kann daher wie auch bei anderen Parallelsystemen mit einem erhöhten konstanten Anteil in der Zuluft umgesetzt werden (Havel et al., 2008).

Die Prozessentwicklung im Labormaßstab findet häufig statt, ohne eine spätere Maßstabsvergrößerung zu bedenken. Die Produktbildungs- und Biomassebildungsraten fallen nach der Maßstabsvergrößerung in einen Produktionsmaßstab (> 50 L) oft geringer aus als durch Versuche im Labormaßstab anzunehmen war. Eine Vielzahl unterschiedlicher Ursachen kann in direkter Konsequenz zu Abweichungen im Verhalten der Mikroalgenkulturen führen (da Silva & Reis, 2015; Grobbelaar, 2009; Gudin & Chaumont, 1991; Pruvost et al., 2016). Für die Maßstabsvergrößerung von Photobioreaktoren müssen neben den klassischen Problemen wie lokalen Reaktionsbedingungen, Scherstress, Kontamination und Biofilmbildung vor allem auch lichtspezifische Faktoren wie die Abschwächung der Lichtverfügbarkeit über den Reaktorquerschnitt und wetterabhängige Wechsel in Licht und Temperatur berücksichtigt werden (Benner et al., 2022). Bei der Kultivierung photoautotropher Mikroorganismen hängen die Herausforderungen bei der Skalierbarkeit häufig mit der Lichtverfügbarkeit im Bioreaktor zusammen.

Wenn die übrigen Prozessvariablen nicht limitierend wirken, ist der Lichteintrag in die Algensuspension die wichtigste Variable. Gleiche Eingangspotentialdichten, die auf die Reaktoroberfläche treffen, führen bei abweichenden Schichtdicken in PBR zu unterschiedlichen Wachstumsraten. Dies ist auf die Lichtabsorption durch die Mikroalgen und somit unterschiedliche Lichtverteilung innerhalb der PBR zurückzuführen. Für einen Vergleich verschiedener PBR-Typen besteht ein Ansatz darin, die Lichtabschwächung innerhalb des PBR mathematisch zu beschreiben (J. F. Cornet et al., 1992; Grima et al., 1994; Koller, Löwe, et al., 2017; Suh & Lee, 2003).

Da die Bioreaktoreinheit bisher ausschließlich für heterotrophe Bioprozesse verwendet wurde, ist die Lichtabschwächung im Bioreaktor unbekannt. Das Wissen über die Verteilung von Licht innerhalb eines PBR stellt jedoch die Grundlage für einen erfolgreichen Transfer in andere PBR und Maßstäbe dar und muss daher erforscht werden. Diese ist dabei maßgeblich Abhängig von der Position des Lichteintrags.

Um ein besseres Verständnis und eine quantitative Analyse zu erhalten, sind Modelle zur Beschreibung der Lichtabschwächung und daraus folgender Lichtverteilung wichtig. Für Berechnungen mit solchen Modellen muss die Lichtabschwächung zunächst physikalisch bestimmt werden. Hierfür müssen Transmissionsmessungen durchgeführt und Absorptionsparameter bestimmt werden.

Dies wird mit zwei repräsentativen Mikroalgen untersucht. Zum einen wurde die Mikroalge *Microchloropsis salina* (*M. salina*) ausgewählt, da zu diesem Organismus bereits viel Wissen über Kultivierungen in anderen PBR besteht. Als zweite repräsentative Mikroalge wurde *Scenedesmus ovalternus* (*S. ovalternus*) ausgewählt. Die Süßwasser-alge gehört zur Gattung *Scenedesmus*, welche für resilientes Wachstum bei hohen Temperaturen und Bestrahlungsstärken (Koller, Wolf, et al., 2017) sowie die Produktion von Lipiden bekannt ist (Lorenzen et al., 2017; Matsunaga et al., 2009). Als weitere Eigenschaft sind antimikrobielle Wirkungen der Mikroalge zu nennen (Gupta & Shrivastava, 1965; Ördög et al., 2004). Zu diesem Stamm liegen außerdem bereits experimentelle Daten zum Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Lichtintensitäten aus der Literatur vor (Koller, Löwe, et al., 2017).

Auf den Modellen zur Lichtabschwächung basiert die mittlere integrale Photonenflussdichte. Diese beschreibt eine über die Zeit und Schichtdicke integrierten Wert der Lichtintensität. In der Literatur (Koller, Wolf, et al., 2017; Pfaffinger et al., 2016a) wurde die Wachstumsrate als Funktion der mittleren integralen Lichtverfügbarkeit in der Mikroalgensuspension untersucht und als Inhibitionskinetik beschrieben. Diese kann als Kriterium für den Transfer von Ergebnissen aus den Kultivierungen von Labor-PBR in größere Maßstäbe herangezogen werden (Pfaffinger et al., 2019).

Das Wachstumsverhalten der Algenkulturen wird in dem neuen PBR und in einem Referenz-PBR untersucht, um einen Transfer der Ergebnisse zu beurteilen. Als Referenz-PBR wird in dieser Arbeit eine Flachplatten-PBR mit 20 mm Schichtdicke und einem Arbeitsvolumen von 1,8 L verwendet. Ergebnisse, die in diesem Flachplatten-PBR generiert wurden, konnten bereits in größere Maßstäbe skaliert werden (Koller et al., 2018; Pfaffinger et al., 2019).

3. Theoretische Grundlagen¹

In diesem Kapitel werden verschiedene Charakteristika von Mikroalgen und das damit verbundene Interesse an diesen Organismen beleuchtet. Dabei wird ihr phototropher Metabolismus sowie die essenziellen Faktoren, die ihr Wachstum beeinflussen, genauer betrachtet. Hinzu kommt eine Beschreibung von Produkten aus Mikroalgen. Für die Untersuchung von Mikroalgen werden PBR im Labormaßstab benötigt, deren Anforderungen und Herausforderungen bei der Skalierbarkeit beschrieben werden. Abschließend werden die grundlegenden Konzepte zur mathematischen Beschreibung des photoautotrophen Satzprozesses, der Lichtabschwächung in PBR und Bestimmung von Wachstumskinetiken von photoautotrophen Mikroalgen erläutert.

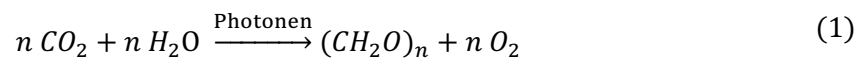
3.1. Mikroalgen

Anhand ihrer Größe können Algen in Makro- und Mikroalgen eingegliedert werden. Makroalgen können mehrere Meter lang werden und sind mehrzellige Organismen (Ander sen, 2005). Mikroalgen sind einzellige Eukaryoten und zeichnen sich durch hohe Wachstumsraten, hohe Biomasseausbeute und die Fähigkeit zur effizienten Fixierung von Kohlendioxid aus, wodurch sie in unterschiedlichen Umgebungen gedeihen können (Bilano vic et al., 2009). Darüber hinaus sind Mikroalgen in der Lage, eine breite Palette wertvoller Verbindungen zu synthetisieren (de Vera et al., 2018). Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Mikroalgen für verschiedene Sektoren wie Lebens- und Futtermittel, Biokraftstoffe, Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel, Abwasserbehandlung und Kohlenstoffbindung (Afonso et al., 2019; de Vera et al., 2018; Øverland et al., 2019; Wu et al., 2016). Ihre einzigartigen Eigenschaften machen sie zu einem attraktiven Kandidaten für die Bewältigung globaler Herausforderungen wie Ernährungssicherheit, nachhaltige Energieversorgung, Umweltsanierung und menschliche Gesundheit (Abdel-Raouf et al., 2012; Alam et al., 2012; Kumari & Singh, 2019; Narayanan et al., 2021; Venkata Subhash & Venkata Mohan, 2014; Venkatraman & Mehta, 2019). Kontinuierliche Forschung und technologische Fortschritte bei der Kultivierung, Ernte und Verarbeitung von Mikroalgen können weiteres Potenzial freisetzen und zur nachhaltigen und resilienten Wertschöpfung beitragen.

¹ Teile dieser Erläuterungen sind bereits publiziert in: Benner, P., Meier, L., Pfeffer, A., Krüger, K., Oropeza Vargas, J. E., & Weuster-Botz, D. (2022). Lab-scale photobioreactor systems: Principles, applications, and scalability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(5), 791–813. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>

3.1.1. Photoautotropher Metabolismus

Mikroalgen können ihre Energie für sämtliche metabolischen Prozesse durch Photosynthese gewinnen und somit photoautotroph wachsen. Die oxygene Photosynthese fängt die Strahlungsenergie des Sonnenlichts ein und wandelt Kohlenstoffdioxid und Wasser in Biomasse und Sauerstoff um. Dabei werden Protonen und Elektronen aus Wassermolekülen genutzt, um Kohlenstoffdioxid zu reduzieren und Kohlenhydrate zu synthetisieren. In stark vereinfachter Form kann diese Synthese mit folgender Gleichung (1) beschrieben werden.



Die Photosynthese findet in den Chloroplasten statt und teilt sich in die aufeinanderfolgende Lichtreaktion und lichtunabhängige Reaktion (Nelson et al., 2005). Die Lichtreaktion wandelt die Lichtenergie in chemische Energie in Form von ATP und NADPH um. In der lichtunabhängigen Reaktion wird diese chemische Energie genutzt, um CO_2 zu reduzieren und Kohlenhydrate zu synthetisieren.

Licht ist eine Form elektromagnetischer Strahlung und besitzt Eigenschaften von Wellen und Teilchen. Diese Teilchen nennt man Photonen und sie besitzen eine Energiemenge die umgekehrt proportional zu ihrer Wellenlänge ist. Mikroalgen und Pflanzen generell können mit Pigmentmolekülen die Lichtenergie bestimmter Wellenlängen aufnehmen und in chemische Energie umwandeln. Trifft ein Photon auf ein Pigmentmolekül kann es reflektiert, transmittiert oder absorbiert werden. Die resultierende absorbierte Strahlung wird als photosynthetisch aktive Strahlung (PAR, photosynthetically active radiation) bezeichnet und liegt im Bereich von 400 bis 700 nm. Diese macht etwa 40 – 50 % des globalen Sonnenlichtspektrums aus (Apel & Weuster-Botz, 2015).

Innerhalb der Chloroplasten sitzen in der Thylakoidmembran große Multiproteinkomplexe, die als Photosystem bezeichnet werden. Chlorophyll a und akzessorische Pigmente (beispielsweise Chlorophyll b und Chlorophyll c, Carotinoide und Phycobiline) bilden dabei Lichtsammelkomplexe, die Lichtenergie auffangen und an das Reaktionszentrum weitergeben. Jedes dieser Pigmente absorbiert Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen, sodass für jede Art ein spezifisches Absorptionsspektrum besteht. Die lichtunabhängige Reaktion der Photosynthese findet im Stroma des Chloroplasten statt und wird durch den Calvin-Zyklus beschrieben. Dieser besteht aus den Schritten Kohlenstofffixierung, Reduktion und Zuckersynthese und Regeneration des CO_2 -Akzeptors. Dabei werden die während der Lichtreaktion gebildeten NADPH und ATP verbraucht (siehe Abb. 2). Obwohl dieser Zyklus lichtunabhängig ist, kann er nur in Kombination mit

der Lichtreaktion stattfinden und wird von Licht beeinflusst (Sadava et al., 2019). Mikroalgen können die beschriebenen Lichtsammelkomplexe und Pigmentzusammensetzung anpassen, um das verfügbare Licht optimal zu nutzen. Bei wenig Licht können Mikroalgen ihre Pigmentierung erhöhen, um das wenige Licht optimal einzufangen. Bei zu hohen Lichtintensitäten kann die Pigmentierung zum Schutz vor zu starker Bestrahlung reduziert werden (Masojidek et al., 2013).

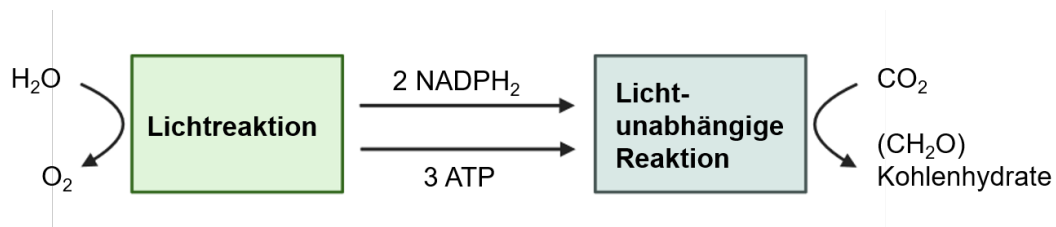


Abb. 2: Schematische Darstellung der oxygenen Photosynthese mit Lichtreaktion und Lichtunabhängiger Reaktion (Abb. nach (Masojidek et al., 2013)).

In Abwesenheit von Licht nutzen Mikroalgen, wie andere Organismen auch, Zellatmung, um aus Kohlenhydraten Energie zu gewinnen. In den Mitochondrien erfolgt die Energiegewinnung durch den Abbau von Speicherstoffen wie Lipide oder Stärke zu CO_2 . In dieser Phase verbrauchen Mikroalgen folglich Sauerstoff, anstatt ihn freizusetzen. Nachts kann bei Mikroalgen eine Abnahme von Biomasse beobachtet werden (Tredici, 2010).

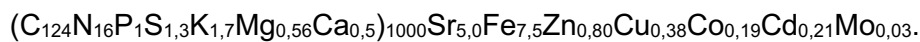
Ein Großteil der globalen Photosynthese-Aktivität wird Algen in Oberflächengewässern zugeschrieben. Dieser Prozess spielt somit eine entscheidende Rolle für den globalen Kohlenstoffkreislauf und die Sauerstoffproduktion und beeinflusst die Zusammensetzung der Erdatmosphäre.

3.1.2. Einflussfaktoren auf das Wachstum von Mikroalgen

Die erfolgreiche Kultivierung von Mikroalgen für verschiedene Anwendungen hängt von einem tiefgreifenden Verständnis bestimmter Prozessvariablen ab, die ihr Wachstum und ihre Zellphysiologie beeinflussen. Neben der Maximierung der Wachstumsrate können die Prozessvariablen auch verändert werden, um die Zusammensetzung der Biomasse zu verändern. Die Produktbildungsrate von intrazellulären Produkten wie Lipide oder Pigmente können so erhöht werden. Die Effekte dieser Variablen auf Mikroalgen sind die Grundlage für das Auslegen von PBR im Produktionsmaßstab und Produktionsprozessen, aber auch für die korrekte Interpretation von Kultivierungen in miniaturisierten Maßstäben (Gayathri et al., 2020; Klein et al., 2021; Madhubalaji et al., 2020).

Die Lichtintensität ist ein kritischer Faktor für das Wachstum von Mikroalgen, da sie als primäre Energiequelle für die Photosynthese dient. Die optimale Lichtintensität ist art-spezifisch und beeinflusst die photosynthetische Effizienz und die Wachstumsrate. Zu wenig Licht kann das Wachstum einschränken, während zu viel Licht zu Photoinhibition und oxidativem Stress führen kann. Die Optimierung der Lichtintensität durch geeignete Photobioreaktordesigns kann die Produktivität von Mikroalgen maximieren (Carvalho et al., 2011; Masojídek et al., 2013).

Die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Reaktionsmedium spielt eine entscheidende Rolle für das Wachstum von Mikroalgen. Als erster Ansatzpunkt kann die gemittelte elementare Zusammensetzung von marinen Mikroalgen dienen:



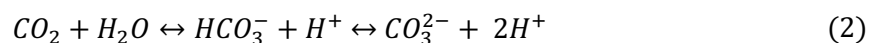
Besonders wichtig sind dabei Stickstoff, Phosphat, Schwefel und Kalium. Neben Magnesium und Calcium müssen auch unterschiedliche Spurenelemente enthalten sein (Ho et al., 2003). Die potenzielle Ausbeute eines spezifischen Produktes aus Mikroalgen ist eine Funktion der Zellzusammensetzung, der Zelldichte und der Wachstumsrate. Diese drei Eigenschaften einer Kultur bedingen sich oft gegenseitig und müssen für den entsprechenden Prozess abgewogen werden. Mikroalgen sind robuste und flexible Organismen, die sich an ihre Umwelt anpassen können. Die biochemische Zusammensetzung von Mikroalgen kann daher beeinflusst werden (Hu, 2013). Ein Nährstoffmangel kann gezielt induziert werden um die Zusammensetzung der Biomasse zu verändern und so beispielsweise die Lipidproduktion zu priorisieren (Schädler et al., 2019).

Durch Wasserverdunstung kann der Salzgehalt im Medium verändert werden. Daher muss technisch die Verdunstung möglichst ausgeglichen werden oder Stämme mit einer breiten Toleranz gegenüber Salzgehalt im Reaktionsmedium verwendet werden. Ein erhöhter Salzgehalt kann zur Ansammlung osmoregulatorischer Solute führen (Borowitzka, 2016). Dies ändert die Zusammensetzung der Biomasse und kann niedrigere Produktausbeuten zur Folge haben.

Die Temperatur bedingt das Wachstum von Mikroalgen, indem sie Stoffwechselraten und zelluläre Prozesse beeinflusst. Dies wirkt sich schließlich auf die Gesamtproduktivität aus (Borowitzka & Vonshak, 2017). Der optimale Temperaturbereich für das Wachstum und die Produktbildung von Mikroalgen hängt von deren Art ab. Robuste Arten können jedoch eine Wassertemperatur zwischen 16 – 35 °C tolerieren (Bezerra et al., 2012; Chisti, 2007; Singh & Singh, 2015; Wolf et al., 2021). Die stammspezifischen optimalen Temperaturbereiche können experimentell bestimmt und durch den später verwendeten

PBR ermöglicht werden. Für große offene Kultivierungsvolumina ist eine aktive Temperaturkontrolle allerdings kaum wirtschaftlich umzusetzen (Borowitzka, 2013b; Brennan & Owende, 2010; Richmond, 2004). Hier müssten geeignete Ansätze zur Temperaturkontrolle und Umgang mit Temperaturschwankungen entwickelt werden. Hier können Methode, die über Verdunstung, Schattierung und Schichtdicke des Photobioreaktors arbeiten, gewählt werden. Wenn kritische Werte und Änderungen der Temperatur auch durch diese Methoden nicht kompensiert werden können, müssen robuste Mikroalgen-Stämme verwendet werden oder Standorte mit gemäßigten Klima gewählt werden. Ein weiterer Ansatz stellt die saisonale Kultivierung unterschiedlicher Mikroalgen-Stämme dar, die besonders heiße oder kalte Zeiträume für die Planung der Kultivierungen mit einbezieht.

Mikroalgen nutzen CO_2 als Kohlenstoffquelle für die Photosynthese und somit Biomasseproduktion. Die CO_2 -Konzentration ist eine wichtige Variable, die sich direkt auf das Wachstum und die Kohlenstofffixierung von Mikroalgen auswirkt. Liegt CO_2 in atmosphärischer Konzentration vor, ist die Versorgung dichter Mikroalgenkulturen limitiert und hohe Produktivität kann nicht mehr erreicht werden. Die Erhöhung der CO_2 -Verfügbarkeit durch CO_2 -Zusatz kann daher die Wachstumsraten der Mikroalgen verbessern. Die Verfügbarkeit von CO_2 steht über das Kohlensäuregleichgewicht mit dem pH in Verbindung. Anorganischer Kohlenstoff liegt in wässriger Lösung in folgendem Gleichgewicht vor Gleichung (2):



Die Kohlenstoffverbindungen liegen in wässriger Lösung zu unterschiedlichen Anteilen abhängig vom pH vor (Abb. 3). Bei saurem pH liegt das Gleichgewicht auf der Seite des CO_2 , sodass bis zu einem pH von etwa 3 der anorganische Kohlenstoff ausschließlich als CO_2 gelöst vorliegt. Ab einem alkalischen pH von etwa 13 jedoch überwiegt der Anteil an CO_3^{2-} . Zwischen pH 3 und 13 kommen die drei anorganischen Kohlenstoffspezies je nach pH in variablen Stoffmengenanteilen im Medium vor. Bei einem leicht alkalischen pH von etwa 8 ist der Anteil von Hydrogencarbonat am höchsten. Allerdings ist die Löslichkeit des anorganischen Kohlenstoffs zusätzlich vom Salzgehalt des Mediums abhängig. Durch Salzgehalt von 3 % im Meerwasser kommt der höchste Molanteil von HCO_3^- bei einem pH von etwa 7,5 vor.

Biologische Membranen weisen eine hohe intrinsische Permeabilität gegenüber CO_2 auf, sodass die passive Aufnahme von gelöstem CO_2 bei allen Mikroalgen durch Diffu-

sion über die Plasmamembran erfolgt (Beardall & Raven, 2013). Zusätzlich können manche Algenspezies HCO_3^- über spezifische Transporter aufnehmen. Mikroalgen, die HCO_3^- in CO_2 durch eine rubiscoständige Carboanhydrase umwandeln können, besitzen somit die Fähigkeit diese Kohlenstoffverbindung zu nutzen (Giordano et al., 2005; Kaplan & Reinhold, 1999). Diese Fähigkeit ist vor allem wichtig bei pH von 8,0 und darüber, da dort hauptsächlich Hydrogencarbonat vorliegt.

Die Aufnahme von anorganischen Kohlenstoff in Form von CO_3^{2-} hingegen ist bei keiner Mikroalgenart bekannt und somit stellt der Molanteil der Kohlenstoffverbindung in Abhängigkeit vom pH eine wichtige Stellgröße bei der Mikroalgenkultivierung dar (Borowitzka, 2016).

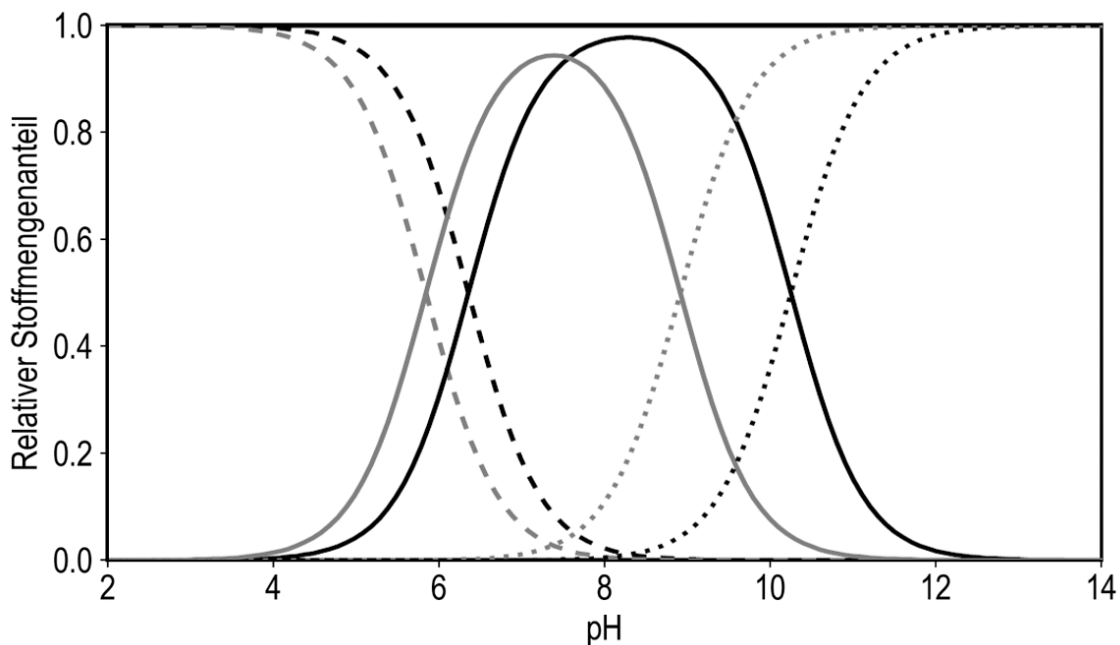


Abb. 3: Relative Gleichgewichtskonzentrationen des Carbonat-Puffersystems in Salzwasser als Funktion des pH und in Abhängigkeit der Salinität (0 %, schwarz und ~3 %, grau) bei 25 °C (Borowitzka & Moheimani, 2013). Abhängig von pH und Salzanteil unterscheiden sich die relativen Stoffmengenanteile des Kohlenstoffdioxids CO_2 (---), des Hydrogencarbonats HCO_3^- (-) und des Carbonats CO_3^{2-} (··) in wässriger Lösung vor.

Die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff durch Mikroalgen führt zu einem vom Gleichgewicht abweichenden Konzentrationsgradienten von CO_2 , HCO_3^- und CO_3^{2-} im umgebenden Medium. Wenn Algen gelöstes CO_2 aufnehmen wird dieses gemäß des Gleichgewichtszustands aus Hydrogencarbonat und Carbonat unter Verbrauch von Protonen nachgebildet und führt in direkter Folge zu einem Anstieg des pH. Löst sich CO_2 aus der Gasphase in Wasser, werden hingegen Protonen bei der Bildung von Hydrogencarbonat freigesetzt, so dass der pH sinkt.

Die pH-Kontrolle durch pH-Regler (Grobelaar, 2013) oder Puffersysteme (Ojo et al., 2015) ist notwendig, um einen stabilen und geeigneten pH für eine maximale Wachstumsrate der Mikroalgen zu erhalten. Puffersysteme sind Lösungen aus einer schwachen Säure oder Base und ihrer korrespondierenden Base oder Säure. Sie können in einem bestimmten Bereich den pH konstant halten. Das hier beschriebene Carbonat-Puffersystem ist ein Beispiel dafür.

Sauerstoff entsteht während der Photosynthese und kann je nach Reaktorsystem ein Vielfaches der Sauerstoffkonzentration der Luft erreichen. Ein erhöhtes Verhältnis von Sauerstoff zu CO₂ führt jedoch dazu, dass in einer lichtabhängigen Reaktion Sauerstoff verbraucht und Kohlenstoffdioxid freigesetzt wird, was auch als Photorespiration bezeichnet wird. Daher muss der Sauerstoff aus dem Reaktionsmedium entfernt werden. Dies kann durch aktive Begasung oder durch passiven Gasaustausch an der Flüssigkeits-Oberfläche stattfinden. Dafür muss ein korrektes Verhältnis von der Oberfläche des PBR zu dessen Volumen verwendet werden (Richmond, 2013).

3.1.3. Produkte aus Mikroalgen

Während des photoautotrophen Wachstums von Mikroalgen wird durch die Nutzung von Kohlendioxid und Lichtenergie auch die Bildung einer Vielzahl von intrazellulären Produkten ermöglicht. Mikroalgen werden kommerziell für die Produktion von hochwertigen Produkten wie Carotinoiden, Lutein und Astaxanthin genutzt, welche dann als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden (Borowitzka, 2013a; Dufossé et al., 2005; Lorenz & Cysewski, 2000; Wolf et al., 2021). Darüber hinaus bilden Mikroalgen Fettsäuren, die in der Lebensmittel- und Futtermittel-, Aquakultur-, Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Maltsev & Maltseva, 2021). Ein Vorteil von Mikroalgen ist dabei, dass sie weniger Fläche benötigen als terrestrische Pflanzen und diese teilweise in Brackwasser kultiviert werden können (Brennan & Owende, 2010). Die von Mikroalgen produzierten Lipide können auch für die Verwendung als Biokraftstoffe und Bioschmierstoffe verarbeitet werden (Abou-Shanab et al., 2014; Alam et al., 2012). Algen sind für die Biokraftstoffproduktion von Vorteil, da sie nicht mit anderen Nahrungspflanzen konkurrieren und auf sonst nicht nutzbaren Flächen angebaut werden können. Dadurch werden Landnutzungsänderungen und die damit verbundenen Emissionen verhindert (Searchinger et al., 2008). Mikroalgen können die Energie des Sonnenlichts effizienter in biochemische Energie umwandeln als terrestrische Pflanzen, was zu schnelleren Wachstumsraten führt, und in indirekter Folge ein mehrmaliges Ernten im Jahr erlaubt (Schenk et al., 2008).

Aktuelle Forschung untersucht die Nutzung von Mikroalgen für die kosteneffiziente Produktion von Biopharmazeutika, welche aber eine genauere Kenntnis ihrer verschiedenen Glykosylierungswege erfordert (Barolo et al., 2020). Rekombinante Mikroalgen können für die Produktion wichtiger Basischemikalien nützlich sein, wie die Polyaminproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* (Freudenberg et al., 2021). Auch Immunstimulanzien und rekombinante Impfstoffe aus Mikroalgen werden in der Aquakultur verwendet (Ma et al., 2020).

Eine weitere Anwendung ist die Abwasserreinigung, bei der Nitrate und Phosphate, die das Ökosystem schädigen und das Grundwasser verunreinigen, von Mikroalgen zum Wachstum genutzt werden (Azizi et al., 2021; Nagarajan et al., 2020). Dabei unterstützen Mikroalgen eine zirkuläre Bioökonomie, da sie die Abwasserbehandlung ermöglichen und gleichzeitig Biomasse produzieren, die in Biokraftstoffe und Produkte mit einem deutlich höheren Wert pro Volumen, wie Antioxidantien oder Pigmente, umgewandelt werden kann (Moreira et al., 2021; Nagarajan et al., 2020; Rajesh Banu et al., 2020). Es ist möglich, dass Mikroalgenstämme in Zukunft kommerziell erfolgreich werden und in vielen Anwendungen eingesetzt werden (Perez-Garcia & Bashan, 2015; Schipper et al., 2021). Da Süßwasser vielerorts bereits während eines Teils des Jahres knapp ist, sind marine Mikroalgen eine gute Alternative, da sie in Salzwasser wachsen können.

Obwohl Mikroalgen ein großes Potenzial für nachhaltige biotechnologische Anwendungen versprechen, müssen viele Bedingungen berücksichtigt werden, um wirtschaftliche Prozesse zu ermöglichen. Neben der regionsspezifischen Wetterlage muss auch eine passende Infrastruktur, wie Straßen für den Transport von Bauteilen und Abtransport von Produkten, Zugang zu ausreichend Wasser und eine sichere politische Lage gegeben sein. Außerdem kann die Implementierung von Multiproduktssystemen, also biotechnologische Anlagen, die aus einer Mikroalgenkultur gleich mehrere Produkte gewinnen, eine ökonomische Produktion ermöglichen. Dabei können auch andere Wertschöpfende Prozesse, wie die Reinigung von Abwasser integriert werden. Die Wahl des PBR und die Stammauswahl sind ebenfalls essentielle Faktoren, die zu berücksichtigen sind. Dabei besteht noch Potenzial in der Entdeckung neuer Stämme oder bei bekannten Stämme weitere Eigenschaften in Produktbildung und Wachstumsverhalten zu erforschen. (Lu et al., 2021; Schipper et al., 2021)

3.2. Photobioreaktoren im Labormaßstab

Um Bioprozesse mit Mikroalgen so effektiv wie möglich zu gestalten und ihren wirtschaftlichen Nutzen zu maximieren, ist es wichtig, den Zusammenhang zwischen Prozessvariablen zu photoautotrophen Wachstums und Produktbildung zu verstehen (Lehr et al., 2012; Yang, 1986). Photobioreaktoren im Labormaßstab werden verwendet, um diese Prozessvariablen zu erforschen.

3.2.1. Anforderungen an den Photobioreaktor und unterschiedliche Bauformen

Neben Prozessvariablen wie Temperatur, pH, gelösten Sauerstoff (engl. dissolved oxygen, DO), Salzgehalt, CO₂-Zufuhr, Energieeintrag und Nährstoffen ist die Verfügbarkeit von Licht ein wesentlicher Faktor für photoautotrophe Bioprozesse (Koller, Löwe, et al., 2017; Koller, Wolf, et al., 2017; Pfaffinger et al., 2019). Es gibt bisher keinen Standardentwurf für einen optimalen PBR im Labormaßstab. Gründe dafür sind unterschiedliche Forschungsfragen und Anforderungen an die Kultivierungen: mehrere Prozesse parallel oder automatisiert durchführen, unterschiedliche Lichtintensitäten und variable Licht- und Schattenbereiche innerhalb den PBR testen, Transmissionsmessungen ermöglichen, Analyse verschiedener Prozessvariablen oder die Algen bewusst unterschiedlichen Stress auszusetzen.

PBR treten in vielen verschiedenen Bauformen auf mit Unterschieden in Energieeintrag, Durchmischung, Lichteintrag, Oberflächen-Volumen-Verhältnis und Verfügbarkeit von Sensoren. Zu den gebräuchlichsten Bioreaktortypen zählen mikrofluidische PBR (Kim et al., 2014) und geschüttelte PBR. Zu letzteren gehören Mikrotiterplatten (Ojo et al., 2015) und Schüttelkolben (Flórez-Miranda et al., 2017; Nayak et al., 2016). Gängige Typen pneumatischer PBR sind Blasensäulen-PBR, zu denen die Airlift-PBR mit Bauteilen für die Zirkulation des Reaktionsmediums (Gayathri et al., 2020) sowie einfachere Bauarten mit einer Kultivierkammer ohne Einbauten, die in einem Inkubator betrieben werden (Havel et al., 2008). Weitere Untergruppen sind Flachplatten-PBR, die sich durch ein vorteilhaftes Verhältnis der Oberfläche zum Volumen auszeichnen (Reyna-Velarde et al., 2010) und Rohr-PBR (Molina et al., 2001). Rührkessel-Bioreaktoren können für photoautotrophe Kultivierungen umgebaut werden. Diese verfügen bereits für heterotrophe Anwendungen über eine Vielzahl Sensoren und erprobter Methoden für die Bestimmung von Prozessparametern, die dann auch für photoautotrophe Prozesse verwendet werden können (Deniz, 2020). Die Lichtquelle wird entweder um den Glaskörper des Bioreaktors (Li et al., 2003) oder im Inneren des Bioreaktors positioniert (Ogbonna et al., 1999). Zuletzt zu nennen sind offene Flachgerinne-PBR, die sich durch eine besonders

dünne Schichtdicke auszeichnen und dadurch besonders hohe Produktbildungsraten erlauben (Schädler et al., 2019).

Bei der Kultivierung von Mikroalgen in PBR im Labor-Maßstab wird der pH üblicherweise durch die Einstellung des CO₂-Gehalts in der Luftzufuhr geregelt (Li et al., 2003; Pfaffinger et al., 2016b). In heterotrophen Bioprozessen wird der pH durch Basen- oder Säuretitration geregelt (Chmiel et al., 2018). Dieser Ansatz lässt sich auch auf die photoautotrophe Kultivierung von Mikroalgen übertragen (Granum & Mykkestad, 2002). In Fällen, in denen Mikroalgenprozesse nicht pH-kontrolliert sind, ist die Verwendung eines selbstpuffernden Mediums zulässig (Ojo et al., 2015).

3.2.2. Miniaturisierte Bioreaktoren

Eine hohe Anzahl an Versuchen ist für die Identifizierung optimaler Prozessbedingungen oder die Durchmusterung neuer Produktionsstämme unerlässlich. Dies hat zur Entwicklung von Mikrobioreaktoren (MBR) geführt, die den Grundsätzen von Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung folgen (Hemmerich et al., 2018; Hortsch & Weuster-Botz, 2010). MBR kommen in Form miniaturisierter Rührkessel-Bioreaktoren (Puskeiler et al., 2005; Weuster-Botz et al., 2005) oder geschüttelten Bioreaktoren (Buchnauer et al., 2009; Funke et al., 2010) vor. Für den automatisierten und unbeaufsichtigten Betrieb inkludieren diese MBR üblicherweise den Betrieb mit einem Pipettierroboter. Neben verschiedenen prokaryotischen Mikroorganismen (Hoefel et al., 2010; Hortsch et al., 2010; Vester et al., 2009) wurden auch Hefen wie *Komagatella pastoris* in miniaturisierten Rührkessel-Bioreaktoren kultiviert, wobei die Skalierbarkeit bis in den m³-Maßstab nachgewiesen wurde (Schmideder et al., 2016). Für Zellkulturen werden MBR mit deutlich geringeren Scherkräften verwendet (Hsu et al., 2012). Für Rührkessel-Bioreaktoren im kleinen Maßstab sind verschiedene Rührorgane für unterschiedliche Aufgaben verfügbar (Hortsch et al., 2010; Puskeiler et al., 2005; Riedlberger & Weuster-Botz, 2012a). Jüngste Entwicklungen in der Mikrobioverfahrenstechnik konzentrieren sich auf neue Sensoren für die online Bestimmung der optischen Dichte (Benner et al., 2020) und die Integration und Vernetzung von mehreren Laborgeräten zur verbesserten Prozesskontrolle und Ressourcennutzung (Bromig et al., 2022).

Im Bereich der Biotechnologie sind Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung in Bioreaktoren im Labormaßstab Stand der Technik, um Kosten zu senken und die Prozessentwicklung zu beschleunigen (Hemmerich et al., 2018; Hortsch & Weuster-

Botz, 2010). Für photoautotrophe Kultivierungen bringen allerdings alle bekannten miniaturisierten PBR spezifische Nachteile mit sich und erfüllen vor allem den Aspekt der Automatisierung nie zufriedenstellend.

3.2.3. Skalierbarkeit

Die Produktbildungs- und Biomassebildungs-raten fallen nach der Maßstabsvergrößerung in einen Produktionsmaßstab (> 50 L) oft geringer aus als durch Versuche im Labormaßstab zu erwarten war. Es kann eine Vielzahl unterschiedlicher Ursachen geben, die in direkter Konsequenz zu Abweichungen im Verhalten der Mikroalgenkulturen führen. Unterschiede in den Umgebungsbedingungen können beispielsweise durch Variation der Lichtintensität hervorgerufen werden, die beispielsweise auf unterschiedliche Schichtdicken der PBR zurückzuführen sind. Unterschiedliche Bauformen der PBR können zu Änderungen der Lichtverteilung, sowie Licht- und Schattenbereichen innerhalb des PBR führen. Der Wechsel von intensiv beleuchteten zu dunklen Bereichen innerhalb des PBR, den die einzelne Mikroalgenzelle erfährt, kann als Hell-Dunkel-Frequenz beschrieben werden und beeinflusst die Mikroalgenkultur. Andere Bauformen oder allein die Vergrößerung des Volumens kann zu Änderungen in der Hydrodynamik führen. In Produktionsmaßstäben werden manche Umgebungsbedingungen (Nährstoffe, pH und Temperatur) nicht so konstant gehalten wie erforderlich. Beispielsweise kann aus ökonomischen Gründen oft keine aktive Temperaturkontrolle genutzt werden und die Algenkultur erfährt standortabhängige Temperaturänderungen über den Tag hinweg (da Silva & Reis, 2015; Grobbelaar, 2009; Gudin & Chaumont, 1991; Pruvost et al., 2016). Ein einfacher Ansatz für die Maßstabsvergrößerung besteht darin, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen konstant zu halten (Koller et al., 2018). Dieser Ansatz würde jedoch die Auswahl an PBR im Labormaßstab einschränken. Demzufolge könnten beispielsweise Rührkessel-PBR aufgrund der geometrisch begründeten schlechten Lichtverfügbarkeit bei größeren Volumina nicht mehr für Vorversuche im Labormaßstab verwendet werden, obwohl sie sich dafür als nützlich erwiesen haben (Deniz, 2020; Li et al., 2003; Mohammed et al., 2014). Für die Maßstabsvergrößerung von Photobioreaktoren müssen neben den klassischen bioverfahrenstechnischen Herausforderungen, wie Heterogenität der Kultur, Scherstress, Kontamination und Biofilmbildung auch lichtspezifische Faktoren wie Gradienten in der Lichtverfügbarkeit und wetterabhängige Wechsel in Licht und Temperatur berücksichtigt werden. Bei der Kultivierung photoautotropher Mikroorganismen hängen die Herausforderungen bei der Skalierbarkeit häufig mit der Lichtverfügbarkeit im Bioreaktor zusammen.

3.3. Modellierung des photoautotrophen Wachstums

Mikrobielles Wachstum und Produktbildung können im Kontext von Bioprozessen mit mathematischen Modellen beschrieben werden. Formalkinetische Ansätze verzichten auf Populations- und Stoffwechselmodelle, um die Komplexität zu reduzieren. Die einzelne Zelle wird dabei als unstrukturierte *black box* definiert, die eine homogene Population repräsentiert (Weuster-Botz & Takors, 2018). Für heterotrophe Bioprozesse wird dabei ein ideal homogenisiertes Reaktionsmedium vorausgesetzt, in dem Substrate in nicht limitierenden Konzentrationen vorliegen. Dies ist für photoautotrophe Prozesse nicht gegeben, da die Lichtabschwächung innerhalb des PBR zu einem Gradienten der Lichtintensität führt. Ab einer bestimmten Zellkonzentration wird das Substrat Licht nicht für alle Zellen ausreichend vorliegen. In diesem Kapitel soll daher neben einem typischen Wachstumsverlauf einer photoautotroph wachsenden Mikroalgenkultur auf Lichtabschwächungsmodelle eingegangen werden, die einen formalkinetischen Ansatz für photoautotrophe Bioprozesse ermöglichen.

3.3.1. Mikroalgenkultivierung im Satzprozess

Der typische Wachstumsverlauf einer photoautotrophen Satzkultivierung ist in Abb. 4 dargestellt. Dieser unterscheidet sich von der eines heterotrophen Satz-Prozesses, da der Verlauf durch Licht als Energiequelle beeinflusst wird. Das Wachstum der Mikroalgenkultur wird vereinfacht mit der Änderung der Biomassekonzentration im Laufe der Prozesszeit beschrieben.

Der Wachstumsverlauf eines Satz-Prozesses kann in mehrere Phasen eingeteilt werden. Während der Verzögerungs-Phase (I) passen sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen an und eine Zunahme der Biomassekonzentration ist noch nicht zu beobachten. Die Dauer der Verzögerungsphase variiert je nach Größe des Inokulums, der Aktivität der Zellen und dem Maße der Änderung der Umgebungsbedingungen im Vergleich zur Vorkultur. Anschließend folgt eine Übergangsphase (II) in der die sich Zellen beginnen zu vermehren. Diese Phase geht über in die exponentielle Wachstumsphase (III) in der sich die Zellen mit konstanter Verdopplungszahl teilen und die Konzentration der Biomasse mit der Zeit exponentiell zunimmt. Bei heterotrophen Prozessen hängt die spezifische Wachstumsrate von der Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Temperatur, dem pH und dem Organismus selbst ab. Bei photoautotrophen Prozessen kommt die Lichtverfügbarkeit hinzu, die in dieser Phase im gesamten Reaktorquerschnitt ausreichend vorliegt. Mit zunehmender Biomassekonzentration wird immer mehr des auf den Bioreaktor auftreffenden Lichts absorbiert. Die Mikroalgen absorbieren nun

das gesamte Licht, sodass Schattenbereiche im Reaktor entstehen. Teile der Kultur erhalten zu wenig Licht, um das exponentielle Wachstum aufrecht zu erhalten. Dies nennt sich Lichtlimitation und führt zur linearen Wachstumsphase (IV), deren Steigung abhängig ist von der insgesamt zugeführten Energie in Form von Licht. Durch weitere Zunahme der Biomassekonzentration nehmen die Schattenbereiche weiter zu, bis die Raten der Photosynthese und Zellatmung sich angleichen. Die Zunahme der Biomassekonzentration flacht in der zweiten Übergangsphase (V) ab, bis die stationäre Phase (VI) erreicht ist. In der stationären Phase bleibt die Biomassekonzentration konstant, und die Wachstumsrate ist gleich der Absterberate. In der Absterbephase (VII) nimmt die Biomassekonzentration ab, da die Zellen eine Zelllyse durchlaufen. Die Absterbephase ist in der Regel eine Folge von Nährstoffmangel (Chmiel et al., 2018). Der Wachstumsverlauf eines Satz-Prozesses liefert wichtige Informationen über den Eigenschaften der untersuchten Mikroorganismen und kann zur Optimierung der Bedingungen für das Zellwachstum in biotechnologischen Prozessen verwendet werden.

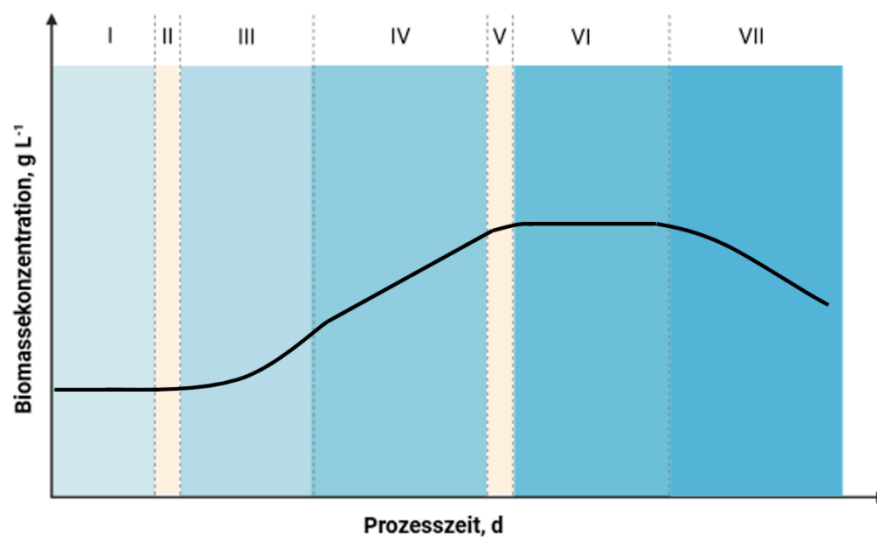


Abb. 4: Typischer Wachstumsverlauf einer photoautotrophen Kultivierung im Satzprozess. (I) Verzögerungsphase, (II) Übergangsphase, (III) exponentielle Wachstumsphase, (IV) lineare Wachstumsphase, (V) Übergangsphase, (VI) stationäre Phase, (VII) Absterbephase.

Die Zunahme der Zellzahl der Kultur korreliert linear mit der Zunahme der Zellmasse. Sind diese Voraussetzungen gegeben, kann über den Wachstumsverlauf mit der Biotrockenmassekonzentration die exponentielle Wachstumsrate während Phase III bestimmt

werden. Für eine Satzkultivierung kann die exponentielle Wachstumsrate μ nach Definition (3) beschrieben werden.

$$\mu = \frac{1}{c_x} * \frac{dc_x}{dt} \quad (3)$$

Mit μ exponentielle Wachstumsrate, d^{-1}
 c_x Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
 t Zeit, d

3.3.2. Lichtabschwächung im PBR

Durch Reflexion, Transmission und Absorption durch Mikroalgenzellen, entsteht ein Gradient der Lichtintensität innerhalb des PBR. Die Lichtabschwächung innerhalb des PBR kann durch seine Wirkung auf die Zellen beschrieben werden, was in Abb. 5 dargestellt ist. Die Absorption von Licht führt zu Zonen der Photoinhibition (I, Hemmung durch zu starkes Licht), der idealen Beleuchtung (II) und der Lichtlimitierung (III, Limitierung durch zu wenig Licht). Dies kann in Folge zu örtlich unterschiedlichen Wachstumsraten im PBR führen.

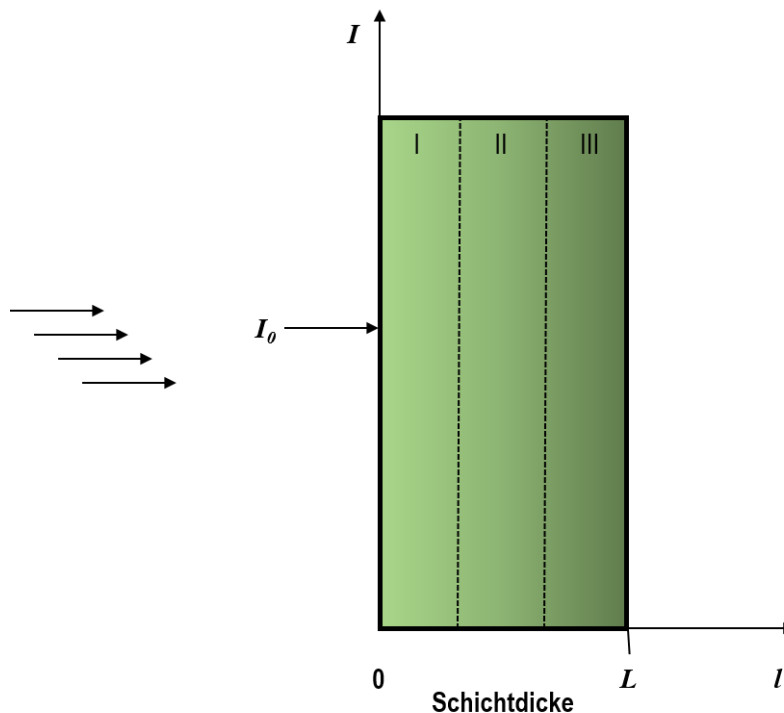


Abb. 5: Schematische Darstellung der Lichtabschwächung innerhalb eines einseitig beleuchteten PBR. Die Lichtabschwächung führt zu Ausbildungen von drei Zonen: (I) Photoinhibition, (II) ideale Beleuchtung und (III) Lichtlimitierung.

Lichtabschwächungsmodelle versuchen, die Lichtverteilung innerhalb des PBR mathematisch zu beschreiben. Wenn die übrigen Prozessvariablen nicht limitierend wirken, ist der Lichteintrag die wichtigste Variable. Identische einfallende Lichtintensitäten sind bei unterschiedlichen PBR-Geometrien schwer zu vergleichen, wenn unterschiedliche Schichtdicken oder Oberflächen-Volumen-Verhältnisse vorliegen. Um ein besseres Verständnis und eine quantitative Analyse der Lichtverteilung im PBR zu erhalten, muss die Lichtabschwächung bekannt sein. Die Komplexität der Lichtabschwächung variiert mit den verschiedenen Geometrien. Der einfachste Fall ist die Lichtabschwächung in einem einseitig beleuchteten Flachplatten-PBR, die als zweidimensionale Funktion für die Lichtschwächung beschrieben werden kann (Koller, Löwe, et al., 2017). Flachplatten-PBR können auch beidseitig beleuchtet werden, was eine homogenere Ausleuchtung ermöglicht (Jacobi et al., 2012). Die Lichtschwächung in runden PBR, wie beispielsweise Blasensäulen-PBR, wird bei Beleuchtung von außen durch den Fokussierungseffekt beeinflusst und muss dreidimensional oder mit einem Faktor für den Fokussierungseffekt beschrieben werden (Heining et al., 2015; Jacobi et al., 2012). Bei interner Beleuchtung muss die Lichtverteilung dreidimensional modelliert werden (Suh & Lee, 2003).

Das Lambert-Beer-Gesetz (Gl. 4) ist ein gängiger Ansatz zur Beschreibung der Abschwächung der Lichtintensität bei der Ausbreitung durch eine Suspension. Die Eingangsphotonenflussdichte I_0 trifft auf die Oberfläche der Suspension und breitet sich durch diese aus. Die Photonflussdichte I schwächt sich in Abhängigkeit von der Schichtdicke L des Bioreaktors, der Biotrockenmassekonzentration und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ab.

$$I = I_0 * e^{-\varepsilon \cdot c_x \cdot L} \quad (4)$$

| | | |
|-----|---------------|---|
| Mit | I | Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | I_0 | Eingangsphotonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | ε | Extinktionskoeffizient, $\text{L g}^{-1} \text{m}^{-1}$ |
| | c_x | Biomassekonzentration, g L^{-1} |
| | L | maximale Schichtdicke, m |

Neben dem Lambert-Beer-Gesetz gibt es modifizierte Versionen des Lambert-Beer-Gesetzes (Franco-lara et al., 2006) oder andere Funktionen (Reynolds & Pacala, 1993), die die Lichtabsorption innerhalb der Suspension beschreiben können. Anspruchsvollere Modelle enthalten weitere Parameter zur Beschreibung weiterer physikalischer Vorgänge wie Lichtstreuung (J. F. Cornet et al., 1992).

3.3.3. Mittlere integrale Photonenflussdichte

Unter der Annahme, dass Licht die einzige wachstumslimitierende Zustandsvariable ist und dass die Mikroalgensuspension homogen durchmisch ist, kann eine integrale Photonenflussdichte für die gesamte Mikroalgensuspension berechnet werden (J.-F. Cornet et al., 1995; Grima et al., 1994). Im Ergebnis entspricht dies einer integralen Photonenflussdichte I^* , die jede einzelne Zelle im Durchschnitt erfährt Gl. (5).

$$I^*(c_x) = \frac{1}{L} \int_0^L I(c_x, l), dl \quad (5)$$

| | | |
|-----|-------|---|
| Mit | I^* | Integrale Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | c_x | Biomassekonzentration, g L^{-1} |
| | L | maximale Schichtdicke, m |
| | I | Funktion nach Gleichung (4) |
| | l | Schichtdicke, m |

Schematisch kann die Lichtabsorption über den Reaktorquerschnitt wie in Abb. 6 dargestellt werden.

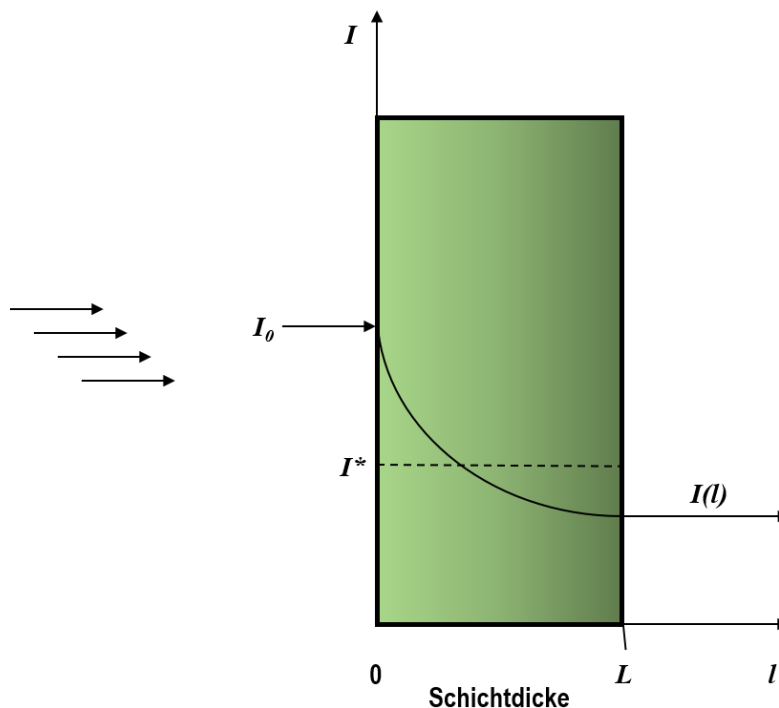


Abb. 6: Schematische Darstellung der Lichtabschwächung in einem einseitig beleuchteten PBR nach (Pruvost & Cornet, 2012). Die Eingangspotonenflussdichte I_0 trifft auf den PBR. Die Photonenflussdichte I nimmt als Funktion von der Schichtdicke l ab. Bei der maximalen Schichtdicke L tritt das transmittierte Licht aus dem PBR aus. Die Integration von $I(l)$ ergibt die integrale Photonenflussdichte I^* .

Da die Biomassekonzentration während des exponentiellen Wachstums ansteigt, nimmt auch die Lichtabschwächung mit der Prozesszeit zu. Infolgedessen kann eine mittlere integrale Photonenflussdichte I^{**} innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase berechnet werden (Pfaffinger et al., 2016b). Die mittlere integrale Photonenflussdichte I^{**} ist eine Funktion der einfallenden Lichtintensität I_0 , der Lichtabsorption, der Schichtdicke, der Biomassekonzentration der Mikroalgen und der Wachstumsrate μ innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls Δt Gl. (6).

$$I^{**} = \frac{1}{t_e - t_a} \int_{t_a}^{t_e} I^* dt \xrightarrow{\frac{dc_x = \mu * c_x \rightarrow dt = \frac{dc_x}{\mu * c_x}}{}} I^{**} = \frac{1}{t_e - t_a} \int_{c_{x,a}}^{c_{x,e}} \frac{I^*}{\mu * c_x} dc_x \quad (6)$$

| | | |
|-----|-----------|---|
| Mit | I^{**} | Mittlere integrale Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | t_a | Beginn exponentielle Wachstumsphase, d |
| | t_e | Ende exponentielle Wachstumsphase, d |
| | $c_{x,a}$ | Biomassekonzentration zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, g L^{-1} |
| | $c_{x,e}$ | Biomassekonzentration zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase, g L^{-1} |
| | μ | Wachstumsrate, d^{-1} |

Die mittlere integrale Photonenflussdichte I^{**} ist eine geeignete Größe für die Beschreibung der lichtabhängigen Wachstumskinetik von Mikroalgen in Abhängigkeit von der Lichtverfügbarkeit. Die Integration kann auf verschiedenen Lichtschwächungsmodellen basieren wie dem Lambert-Beer-Gesetz oder Schuster (Koller, Löwe, et al., 2017; Pfaffinger et al., 2016b).

3.3.4. Wachstumskinetik

Die Wachstumskinetik von Mikroalgen ist artspezifisch, und verschiedene Stämme weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Die Untersuchung der Wachstumskinetik bestimmter Stämme im Labormaßstab ermöglicht die Ermittlung geeigneter Kultivierungsbedingungen und gezielter Strategien für die Biomasseproduktion. Darüber hinaus ermöglicht das Wissen über die Wachstumskinetik die Modellierung des Wachstums von Mikroalgen, was die Prozessoptimierung und die Gestaltung von PBR im Produktionsmaßstab erleichtert.

Liegt eine Beschreibung der Lichtabschwächung vor, so kann die mittlere spezifische Wachstumsrate als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte modelliert werden. Hierbei ist die Wachstumskinetik also allein von der Lichtverfügbarkeit abhängig. Eine weitere Limitierung wird hierbei nicht berücksichtigt. Für *M. salina* und *S. ovalternus* wurden bereits die exponentiellen Wachstumsraten als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte I^{**} ermittelt und als stammspezifische Lichtantwortkurven unter konstanter Bestrahlung vorgestellt (Koller et al., 2018; Pfaffinger et al., 2019). Sie zeigten, dass die Lichtantwortkurve gut durch ein modifiziertes Inhibitionsmodell beschrieben werden kann, wie in Gleichung (7) dargestellt (Andrews, 1968; Lee et al., 1987).

$$\mu = \mu_{max} * \frac{I^{**}}{K_s + I^{**} + I^{**} * \left(\frac{I^{**}}{K_i}\right)^\varphi} \quad (7)$$

| | | |
|-----|-------------|---|
| Mit | μ | spezifische Wachstumsrate, d^{-1} |
| | μ_{max} | Maximale Wachstumsrate, d^{-1} |
| | I^{**} | Mittlere integrale Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | K_s | Sättigungskonstante der Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | K_i | Photoinhibitionskonstante, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | φ | Sensitivitätsparameter, - |

Dieser kinetische Ansatz berücksichtigt Licht als das einzige essentielle Substrat, welches sowohl limitierend als auch inhibierend auf die spezifische Wachstumsrate wirken kann. Der Verlauf einer Lichtantwortkurve, welche auf Gleichung (7) basiert, ist in Abb. 7 dargestellt. Hierbei soll besonders der Effekt des Sensitivitätsparameters verdeutlicht werden. Der Sensitivitätsparameter entspricht der negativen Steigung der lichtabhängigen Wachstumskinetik im Wendepunkt des photoinhibierten Bereichs der Kinetik ($I^{**} = K_i$). Der Parameter führt bei einem Wert < 1 zu einem flacher und bei einem Wert > 1 zu einem steiler ausgeprägten Verlauf der Kurve.

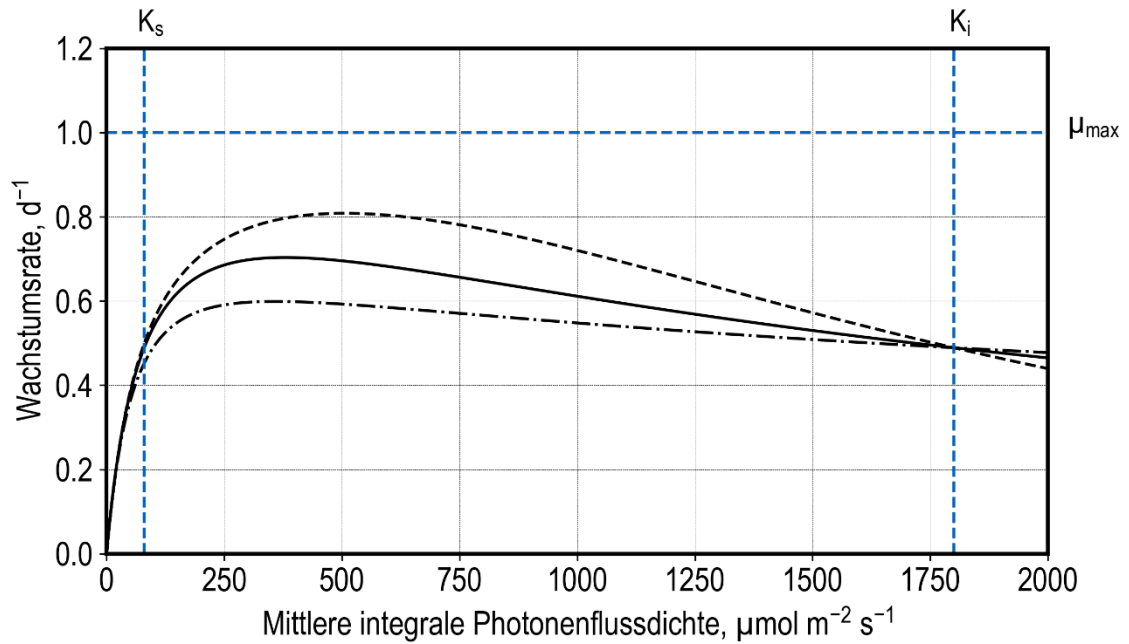


Abb. 7: Darstellung des in Gleichung (7) dargestellten kinetischer Ansatzes zur Beschreibung der Wachstumsrate als Funktion des limitierenden Substrates Licht mit Berücksichtigung der Substratinhibition. Die Sättigungskonstante K_s entspricht $80 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, die Inhibitionskonstante K_i entspricht $1800 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ und μ_{max} entspricht 1. Der Sensitivitätsparameter wurde variiert zwischen 0,5 (-), 1(-), und 2 (--).

4. Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle konstruktiven und analytischen Methoden, sowie Methoden zur Kultivierung von Mikroalgen beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Dabei werden ebenfalls die verwendeten Materialien und Anlagen genannt. Diese sind außerdem in tabellarischer Form im Anhang gelistet.

4.1. Konstruktive Methoden

Für die Konzeption und Bau eines Beleuchtungsmoduls zur Kultivierung von Mikroalgen waren konstruktive Methoden notwendig, die im Folgenden beschrieben werden.

4.1.1. Auswahl Leuchtmittel

Für die Suche eines geeigneten Leuchtmittels wurde die Auswahl auf Leuchtdioden (LEDs) fokussiert. Diese zeichnen sich durch eine geringe Größe, Langlebigkeit und, im Vergleich zu anderen Leuchtmitteln, niedrige Wärmeentwicklung aus (Glemser et al., 2016). Außerdem sind sie auch abseits von Forschung und Entwicklung weit verbreitet und somit auch in geringen Stückzahlen für den Prototypenbau zu erwerben. Aufgrund des limitierten Platzes für Leuchtmittel und Kühlung beim Bau eines Beleuchtungsmoduls für miniaturisierte Photobioreaktoren, sind die genannten Eigenschaften ideale Voraussetzung. Generell gewinnt der Einsatz von LEDs bei der Kultivierung von Mikroalgen für Forschung und Entwicklung zunehmend an Bedeutung (Glemser et al., 2016).

Erläuterung: LEDs können entweder durch konstante Stromreduzierung (CCR, analoges Dimmen) oder Pulsweitenmodulation (PWM, digitales Dimmen) gedimmt werden. Beim Dimmen mittels PWM wird mit einer bestimmten Frequenz zwischen dem Zustand "ein" und "aus" gewechselt. Das Verhältnis zwischen der Einschaltzeit und der Gesamtzeit definiert die durchschnittlich abgegebene Leistung. Beim Dimmen von Licht liegt die Frequenz in der Regel außerhalb der menschlichen Wahrnehmung (> 100 Hz). PWM Treiber für das Dimmen von LEDs haben einen großen linearen Dimmbereich, (Dyble et al., 2005). Das analoge Dimmen mit CCR erfolgt durch Änderung des Vorwärtsstroms an der LED. Die Lichtintensität der LEDs korreliert direkt mit dem angelegten Strom, ist jedoch nur für niedrige Ströme linear. Außerdem kann eine Verschiebung im Spektrum auftreten, da dieses vom Vorwärtsstrom abhängig ist (Dyble et al., 2005; Zafar et al., 2015).

LEDs haben ein definiertes Emissionsspektrum und können dabei in ganz Unterschiedlichen Wellenlängen gefertigt werden, die allerdings nur bedingt zur Algenzucht geeignet sind. Licht mit einer Wellenlänge zwischen 400 – 700 nm wird als photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) definiert (MacIntyre & Cullen, 2005; Richmond, 2008). Innerhalb des PAR-Bereichs wird das Licht vom Chlorophyll der Mikroalgen und den zugehörigen Pigmenten mit unterschiedlicher Effizienz absorbiert. Einige Studien haben das Algenwachstum nur mit rotem und / oder blauem Licht analysiert (Cordara et al., 2018; Mohammed et al., 2014; Wagner et al., 2016; C.-Y. Wang et al., 2007). Wenn die Kultivierungen jedoch dazu dienen wirtschaftliche Produktionsprozesse zu entwickeln, wird Sonnenlicht vermutlich weiterhin die primäre Energiequelle sein müssen. Aus diesem Grund wird weißes Licht mit einem breiten Spektrum bei Photobioreaktoren im Labormaßstab bevorzugt, wenn eine Maßstabsübertragung von Prozessen angestrebt wird. Im Rahmen dieser Arbeit werden daher ausschließlich weiße LEDs überprüft.

Die Spektren der Leuchtmittel wurden mit einem FLAME-Mikrospektrometer (Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland) und der Software Ocean View (Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland) aufgezeichnet.

4.1.2. Leiterplattenfertigung

Die Aluminiumleiterplatte wurde mit Fusion360 (Autodesk, San Rafael, CA, USA) entworfen und von der Fischer Leiterplatten GmbH (Witten, Deutschland) mit einer Stärke von 1,5 mm gefertigt. Der Lötstopplack wurde dabei in weiß gewählt, um möglichst viel Licht Richtung Bioreaktor zu reflektieren. Die Leiterplatten wurden mit Lötpaste auf den Kontakten benetzt und die LEDs sowie die SMD-Leiterplattenklemmen positioniert. Anschließend wurde die gesamte Leiterplatte mit einer laborgerechten Heizplatte auf 250 °C erhitzt, sodass die Lötpaste schmolz und sich die LEDs ausrichteten.

4.1.3. Fertigung des Kühlkörpers

Der Aluminium-Wärmetauscher wurden mit einer Open-Source-CAD-Software (FreeCAD, Version 0.19, Computer Software, (2022), <https://freecad.github.io/SourceDoc/>, Zugriff am 1. August 2022) entworfen. Der Kühlkörper wurde mit einer computergesteuerten Fräsmaschine (Fp 3 Nc, Friedrich Deckel AG, München, Deutschland, heute DMG Mori AG, Bielefeld, Deutschland; Steuerung: TNC 430, Heidenhain GmbH, Traunreuth, Deutschland) aus einem Aluminiumblock gefertigt. Dabei wurden Aussparungen für ein Edelstahlrohr (6 mm Durchmesser), Pins zur Positionierung auf der Arbeitsfläche des

Pipettierroboters und Aussparungen für die Einhausung gefräst. Das Edelstahlrohr wurde zusammen mit Wärmeleitpaste in die Ausfräsung gesetzt und an den Enden mit Schneidringverschraubungen und Aufschraub-Schlauchtüllen versehen, um diese an ein Thermostat anzuschließen.

4.1.4. Filament 3D-Druck

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Bauteile mittels additiver Fertigung erstellt. Das Gehäuse der Beleuchtungsmodule (Abb. A3), die Lichtsensorhalterungen (Abb. A1 und A4) und das Gehäuse der Steuereinheit (vgl. Abb. 27) wurden mit einer Open-Source-CAD-Software (FreeCAD, Version 0.19, Computer Software, (2022), <https://free-cad.github.io/SourceDoc/>, Zugriff am 1. August 2022) entworfen.

Die Entwürfe für alle 3D-gedruckten Teile wurden mit der Software PrusaSlicer 2.2.0 (Prusa Research, Prag, Tschechische Republik) vorbereitet und mit einem Filamentdrucker (Prusa i3 MK3, Prusa, Prag, Tschechische Republik) gedruckt. Für die Steuereinheit wurden Filamente aus Polyethylenterephthalat (PETG, Extrudr, Lauterach, Österreich) und für das Gehäuse des Beleuchtungsmoduls und die Lichtsensorhalterungen thermoplastische Polyurethanfilamente (TPU hart, Extrudr, Lauterach, Österreich) verwendet.

4.1.5. Stromversorgung und Steuerung

Zur Steuerung der Lichtintensität der LEDs wurde eine Konstantstromquelle gewählt, die einen Anschluss für ein PWM-Signal besitzt. Ein entsprechendes Signal wird in diesem Fall von einem Mikrocontroller ausgegeben. Die erforderlichen Komponenten können hierbei auf einem einzigen Chip gesichert werden, ein so genanntes "System on a Chip" (Adi et al., 2021). Die Software zur Steuerung wurde in den Read Only Memory (ROM) geladen.

4.2. Mikroalgenstämme und Reaktionsmedien

Das Wachstum von *Microchloropsis salina* (*M. salina*, SAG 40.85) und *Scenedesmus ovalternus* (*S. ovalternus*, SAG 52.80) wurde in miniaturisierten Rührkessel-PBR und Flachplatten-PBR untersucht. Beide Stämme wurden aus der Algenkultursammlung der

Universität Göttingen bezogen. Die Kulturen wurden in Schüttelkolben bei Raumtemperatur und Umgebungslicht aufbewahrt, bis daraus Vorkulturen hergestellt wurden. Tägliches Schütteln der Kolben verhinderte die Sedimentation der Zellen.

M. salina wurde in modifiziertem künstlichem Meerwasser (ASW) nach dem Verfahren von Boussiba et al. kultiviert (Boussiba et al., 1987). ASW bestand aus NaCl (27 g L⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (6,6 g L⁻¹), CaCl₂ · 2 H₂O (1,5 g L⁻¹), KNO₃ (5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (0,07 g L⁻¹), Na₂EDTA · 2 H₂O (0,021 g L⁻¹), FeCl₃ · 6 H₂O (0,014 g L⁻¹), und 1 mL L⁻¹ einer Spurenelementlösung aus ZnCl₂ (0,04 g L⁻¹), H₃BO₃ (0,6 g L⁻¹), CuCl₂ · 2 H₂O (0,04 g L⁻¹), MnCl₂ (0,4 g L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (0,37 g L⁻¹).

S. ovalternus wurde in BG-11-Medium nach dem Verfahren von Waterbury und Stanier (Waterbury & Stanier, 1981) mit NaNO₃ (1,5 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0,04 g L⁻¹), Na₂CO₃ (0,02 g L⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (0,75 g L⁻¹), CaCl₂ · 2 H₂O (0,036 g L⁻¹), Na-EDTA (0,001 g L⁻¹), Zitronensäure (0,006 g L⁻¹) und Eisenammoniumcitrat (0,006 g L⁻¹) hergestellt. Die Zusammensetzung der Spurenelemente wurde von Kuhl und Lorenzen abgeleitet (Kuhl & Lorenzen, 1964): ZnSO₄ · 7 H₂O (0,287 g L⁻¹), MnSO₄ · 4 H₂O (0,223 g L⁻¹), H₃BO₃ (0,061 g L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (0,0125 g L⁻¹) und CuSO₄ · 5 H₂O (0,0025 g L⁻¹).

Für beide Medien wurde der pH mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und anschließend wurden die Medien durch Filtrieren sterilisiert.

4.3. Vorkultur in Blasensäulenreaktoren

Zur Herstellung aller Vorkulturen wurden 400 mL Blasensäulen-PBR mit einem Arbeitsvolumen von 200 mL verwendet (Havel et al., 2008). Die PBR wurden in einen Inkubator (Profors, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) positioniert, der auf 25 °C temperiert wurde. Die Gasflussraten wurden auf Sicht manuell mit einem Ventil eingestellt, sodass eine ausreichende Durchmischung gewährleistet ist. Das Gas bestand aus Druckluft, die mit 2 % CO₂ gemischt war. Die Beleuchtung wurde durch sechs Fluoreszenzröhren realisiert, die oberhalb der Blasensäulenreaktoren befestigt waren und zusammen eine Photonflussdichte von 85 μmol m⁻² s⁻¹ ausstrahlten. Lag der offline gemessene pH außerhalb des Bereichs von 7,5 – 8,5, wurde dieser nach Bedarf manuell mit 0,5 M NaOH oder 0,5 M HCl angepasst. Sobald eine Zelldichte von OD₇₅₀ über 3,0 gemessen wurde, wurde eine neue Vorkultur mit einer OD₇₅₀ von 0,15 gestartet.

4.4. Kultivierung in parallelen Rührkesselbioreaktoren

Die Kultivierung von Mikroalgen in parallelen Rührkesselbioreaktoren erfordert methodisches Wissen in der Handhabung der Bioreaktoreinheit selbst, der Integration in einen Pipettierroboter und Wahl der Prozessvariablen wie Begasung und Rührertypen. Alle Aspekte der Kultivierung werden in diesem Kapitel behandelt.

4.4.1. Parallele Rührkesselbioreaktoren

Die parallele Rührkessel-Bioreaktoreinheit im mL-Maßstab (bioREACTOR48, 2mag AG, München, Deutschland) wurde mit 48 Einweg-Bioreaktoren aus Polystyrol ohne Schikanen (HTBD, 2mag AG, München, Deutschland) bestückt. Die Mikroalgensuspension wurde mit magnetisch angetriebenen S-Rührern homogenisiert, die ursprünglich für das Mischen von Feststoffen entwickelt wurden (Riedlberger & Weuster-Botz, 2012b). Die Rührer waren auf Achsen aus Vollmaterial montiert, die an dem Deckel der parallelen Bioreaktoreinheit befestigt waren. Eine Gasmischstation (DASGIP MX 4/4, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) führte sterile, mit CO₂ gemischte Luft in den Deckel der Bioreaktoreinheit, welcher diese auf die Kopfräume aller 48 parallelen Bioeaktoren verteilte. Der Deckel der Bioreaktoreinheit bietet für jeden Bioreaktor eine Öffnung, die als Gasauslass und zur Probenahme diente.

4.4.2. Integration in einen Pipettierroboter und Prozesskontrolle

Die Bioreaktoreinheit wurde in einen Pipettierroboter mit acht Pipettierkanälen und einem Greifarm (Microlab STARlet, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) eingebaut. Das Layout der Arbeitsfläche des Pipettierroboter ist in Abb. 8 dargestellt. Für die wiederholte OD₇₅₀- und pH-Analyse der Kulturen wurden automatisiert Proben aus den parallelen Bioreaktoren entnommen und das integrierte MTP-Photometer (Synergy HTX, Biotek, Winooski, VT, USA) und das MTP-Waschstation (405 LS, Biotek, Winooski, VT, USA) vom Pipettierroboter angesteuert. Die wiederverwendbaren Stahlnadeln wurden vor der Probenahme zunächst in 70 % (v/v) Ethanol und anschließend in sterilem Wasser gewaschen. Die von dem Pipettierroboter, dem Photometer und der MTP-Waschstation auszuführenden Aufgaben wurden in einem Methodeneditor programmiert und über eine Laufzeitsteuerungssoftware (Microlab® STAR Software VENUS Version 4.5, Hamilton Bonaduz AG, 205 Bonaduz, Schweiz) abgespielt. Untermethoden wie Probenahme, pH-Messung und Füllstandskorrektur wurden programmiert und automatisch

während des Prozesses ausgeführt. Für die Priorisierung dieser Arbeitsschritte wurde die hausintern entwickelte Ablaufsteuerung genutzt (Bromig et al., 2022).

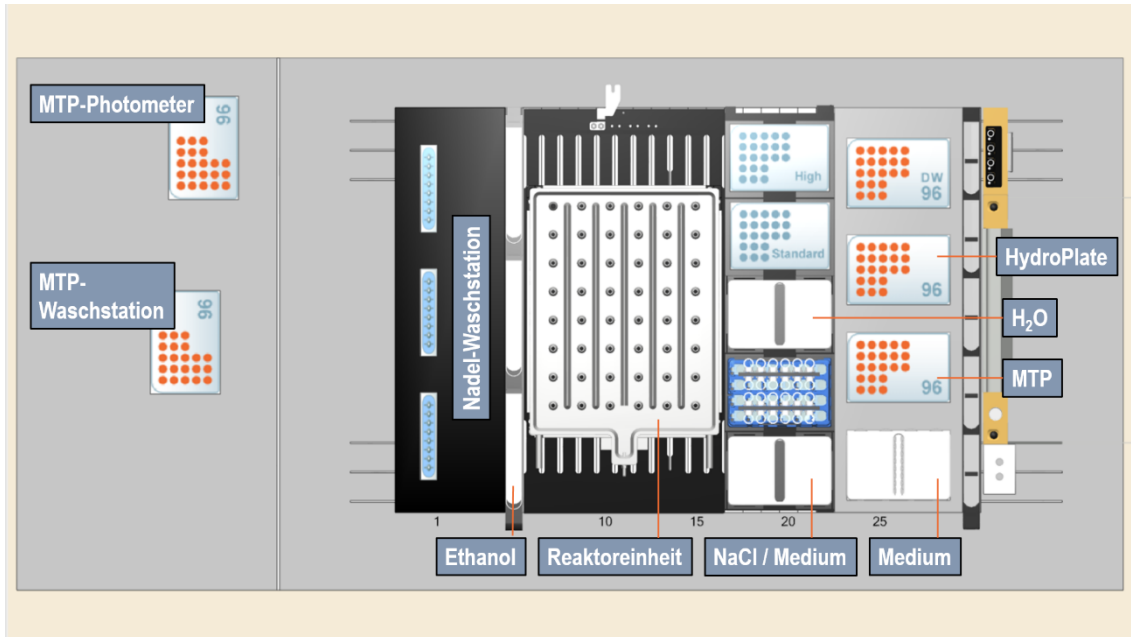


Abb. 8: Layout der Arbeitsfläche des Pipettierroboters zur photoautotrophen Kultivierung von Mikroalgen. Für Kultivierungen mit *M. salina* wurde im Behälter „Medium“ ASW und im Behälter „NaCl / Medium“ NaCl mit 30 g L^{-1} zur Verdünnung von Proben vorgelegt. Während Kultivierungen mit *S. ovalternus* wurde im Behälter „Medium“ BG11-Medium vorgelegt und im Behälter „NaCl / Medium“ ebenfalls BG-11 Medium zur Verdünnung von Proben vorgelegt. Die „HydroPlate“ im MTP-Format dient zur Zwischenlagerung von Proben, nachdem diese aus der Bioreaktoreinheit entnommen wurden und wird zur Bestimmung des pH dieser Proben im MTP-Photometer gemessen. In der MTP werden die Proben verdünnt und anschließend deren OD_{750} gemessen. Beide Platten wurden nach jeder abgeschlossenen Messung im MTP-Photometer in der MTP-Waschstation gespült und auf ihre Ausgangsposition zurückbewegt. Vor jeder Nutzung der Pipettiernadeln wurden diese automatisiert in Ethanol sterilisiert und in der Nadel-Waschstation gespült.

4.4.3. Begasung

Alle photoautotrophen Kultivierungen wurden mit trockener Prozessluft aus Druckluft mit 2 % CO_2 durchgeführt. Die Buchsen aus Teflon, welche ab Werk in den Pipettieröffnungen des Deckels der Bioreaktoreinheit verbaut sind, wurden entfernt, um so den Durchmesser zu vergrößern. Außerdem wurde sichergestellt, dass die Pipettiernadeln mindestens einmal pro Stunde in jeden Bioreaktor einfahren.

Erläuterung: Es konnte beobachtet werden, dass sich in den Pipettieröffnungen mancher Reaktorpositionen Tropfen aus kondensierendem Wasser formen, die eine Öffnung dann verschließen können. Dies ging einher mit nicht reproduzierbarem Wachstum der Mikroalgen.

Die Begasung wurde mittels DO Sensoren überprüft. Diese befinden sich am Boden der Einwegreaktoren und werden für heterotrophe Kultivierungen standardmäßig verwendet. Der Sauerstoffgehalt der Zuluft wurde automatisch und wiederholt zwischen Druckluft und Stickstoff variiert. Acht Bioreaktoren wurden mit Wasser befüllt und bei 1300 U min^{-1} mit S-Rührern gemischt. Anhand des Signals des Sensors konnte die Änderung verfolgt werden. Das Signal von zwei der acht Bioreaktoren sind in Abb. 9 exemplarisch dargestellt. Ein Bioreaktor zeigte nur eine geringfügige Reaktion auf die variierende Zuluft (-, blau), was auf eine mangelhafte Begasung hindeutet. Die übrigen Bioreaktoren weisen über 5 Stunden ein variierendes Signal auf, welches mit der Variation der Zuluft korreliert. Exemplarisch ist hier das Signal eines Bioreaktors (-, rot) dargestellt, welches jedoch mit den übrigen Bioreaktoren übereinstimmt.

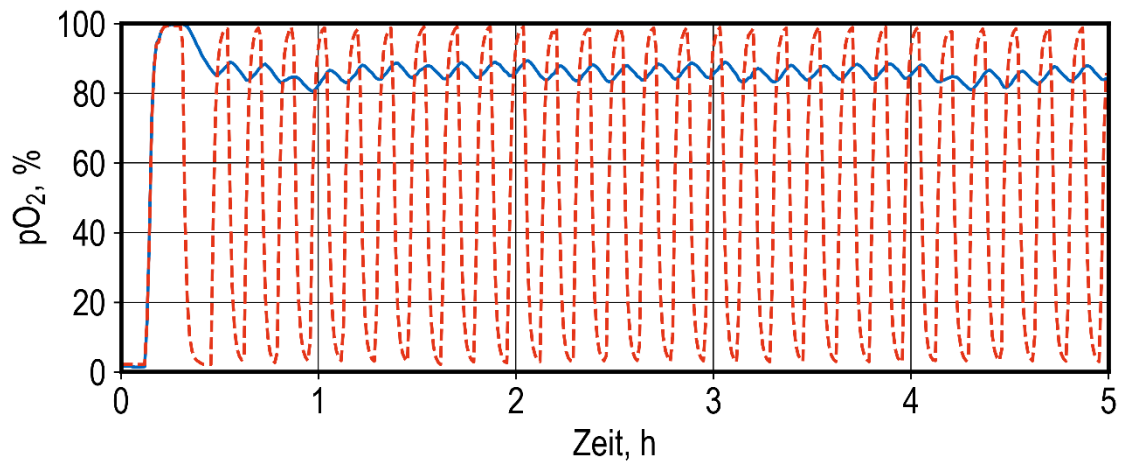


Abb. 9: Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks in zwei exemplarisch ausgewählten Bioreaktoren während stetiger Variation der Zuluft zwischen Druckluft und Stickstoff.

Während der Kultivierung von Mikroalgen erfolgen deutlich weniger Pipettiervorgänge pro Tag im Vergleich zu heterotrophen Prozessen mit Bakterien wie *Escherichia coli*, doch das regelmäßige Einfahren der Pipettierspitzen verdrängt kondensiertes Wasser. Um dem Verstopfen der Öffnungen und damit einhergehenden Ausfall der Begasung entgegenzuwirken, wurde ein stündlicher Pipettierschritt eingeführt.

Erst mit den Änderungen (Entfernung der Buchsen zur Vergrößerung des Durchmessers und regelmäßige Pipettierschritte) konnte der kontinuierliche Verlauf und Reaktion des DO-Signals auf allen Positionen beobachtet werden. Dies ist exemplarisch für eine Position und zwei Zeitabschnitte dargestellt (Abb. 10), stellte sich aber für alle 8 Positionen so dar.

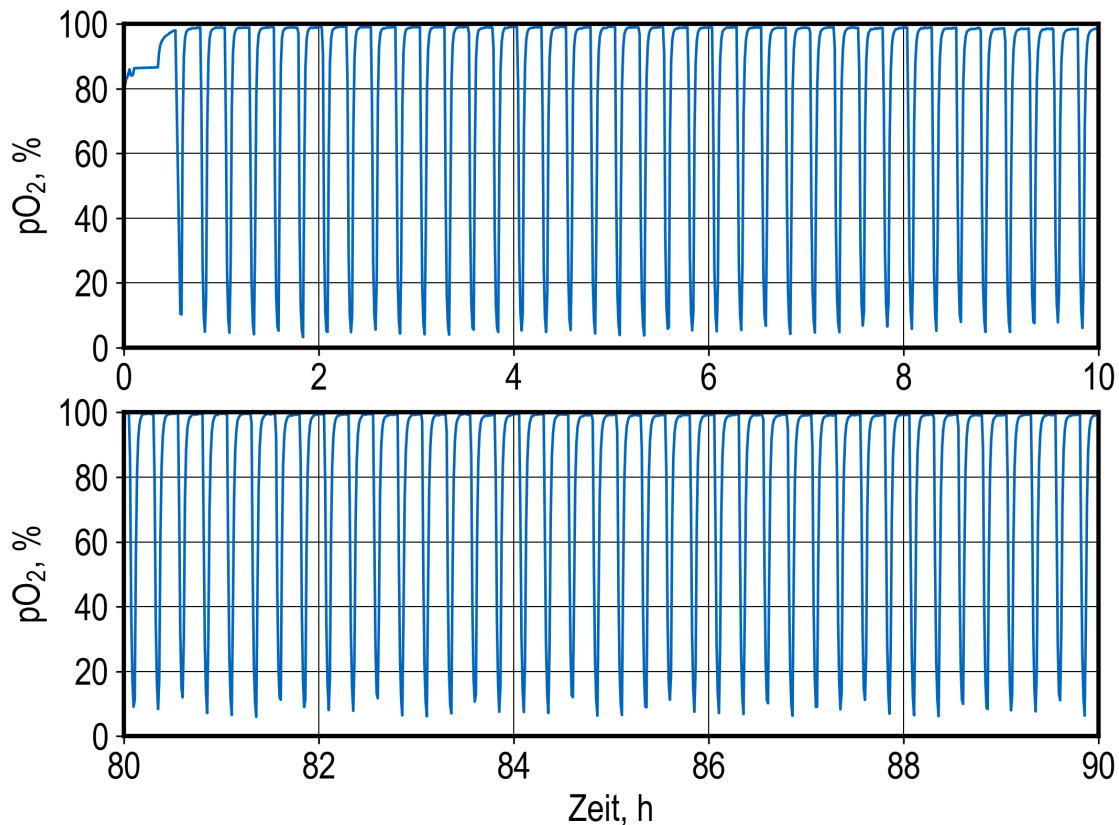


Abb. 10: Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während stetiger Variation des Sauerstoffgehalts der Zuluft (12 min Druckluft, 3 min Stickstoff). Oben sind die ersten 10 h und unten die letzten 10 h des Versuchs dargestellt. Es ist exemplarisch das Signal eines von acht Bioreaktoren dargestellt.

Wird mit feuchter Luft begast kommt es allerdings auch im Deckel der Bioreaktoreinheit zur Kondensation. Dies ist bei wenigen Stunden, was der Zeitskala vieler heterotropher Prozesse entspricht, unproblematisch. Allerdings scheint sich dies nach mehreren Tagen (> 90 h) negativ auf die Begasung der Bioreaktoren auszuwirken. Daher werden die Kultivierungen mit trockenerer Luft durchgeführt. Eine höhere Verdunstungsrate muss dabei akzeptiert werden. Außerdem wird der Deckel nach dem Säubern im Anschluss von Kultivierungen für etwa zwei Tage mit Druckluft getrocknet, um Rückstände von Feuchtigkeit zu minimieren.

4.4.4. Wahl von Rührorganen, Reaktionsvolumen und Rührgeschwindigkeit

Für alle dargestellten photoautotrophen Kultivierungen wurden S-Rührer bei 500 U min^{-1} und 10 mL Reaktionsvolumen verwendet.

Erläuterung: Die Kombination aus Rührorgan, Reaktionsvolumen und Wahl der Rührergeschwindigkeit führen zu unterschiedlich hohen integralen und lokalen Scherkräften in den Bioreaktoren. Diesem Umstand muss besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden, da manche Mikroalgen scherkraftempfindlich sein können (C. Wang & Lan, 2018). In vielen Vorversuchen führten Scherkräfte in den Bioreaktoren zu schlechter paralleler Reproduzierbarkeit. Die Rührerdrehzahl wurde ursprünglich beispielsweise auf 1500 U min^{-1} eingestellt, da dies in Kombination mit einem Paddel-Rührer und 12 mL Volumen zu einer Trombe führt (Abb. 11).

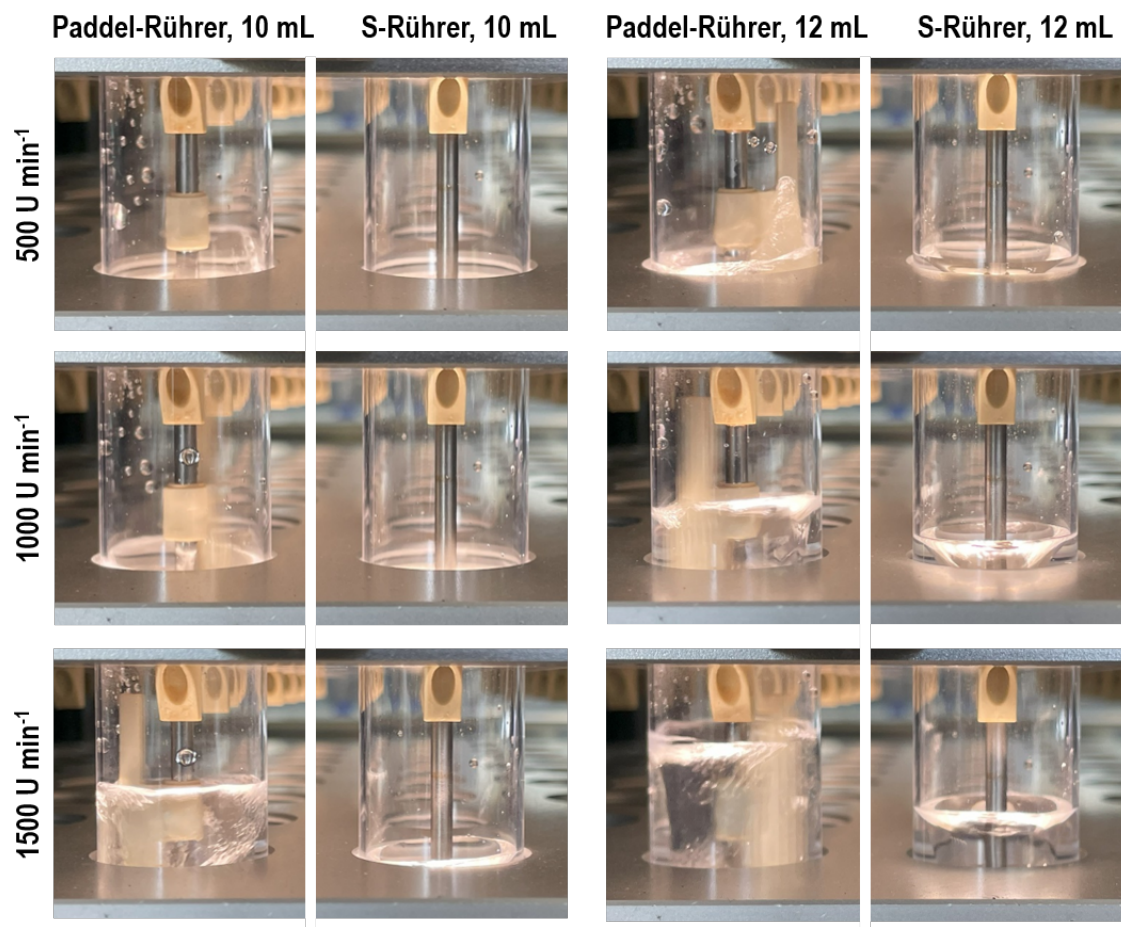


Abb. 11: Darstellung der Flüssigkeitstrombe in miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren. Das Füllvolumen betrug 10 mL oder 12 mL, die Rührerdrehzahl betrug 500 U min^{-1} , 1000 U min^{-1} oder 1500 U min^{-1} und es wurde ein Paddel-Rührer oder S-Rührer verwendet. Obere Bildgrenze entspricht der Kopfraumkühlung der Bioreaktoreinheit und die untere dem Rührantrieb.

Aufgrund der schlechten parallelen Reproduzierbarkeit wurde die Rührerdrehzahl schrittweise reduziert und ein zweiter Rührer (S-Rührer) eingesetzt, der ursprünglich für das Mischen von Feststoffen entwickelt wurde (Riedlberger & Weuster-Botz, 2012b). Bei den niedrigeren Drehzahlen konnte der Paddel-Rührer keine stabile Trombe ausbilden,

weswegen schließlich der S-Rührer verwendet wurde. Bei 500 U min^{-1} wurde ein reproduzierbares Wachstum dokumentiert. Mutmaßlich würde eine zu geringe Rührerdrehzahl keine homogene Durchmischung mehr gewährleisten und zu schlechteren Gasaustausch führen. Die Rührorgane sind in Abbildung 12 fotografisch festgehalten.

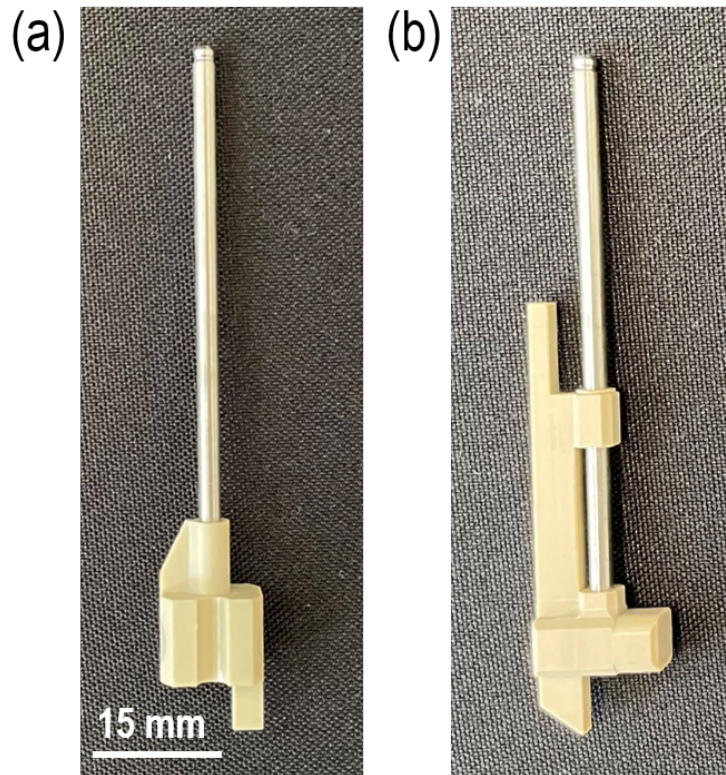


Abb. 12: Rührorgane: (a) S-Rührer mit Vollachse, (b) Paddel-Rührer mit Vollachse

Für heterotrophe Kultivierungen wird typischerweise ein gasinduzierender Rührer verwendet. Die Gasinduzierende Wirkung funktioniert allerdings erst ab Rührerdrehzahlen, die deutlich größer als 500 U min^{-1} sind. Auf die Verwendung von gasinduzierenden Rührern wurde daher für die Kultivierung von Mikroalgen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren verzichtet.

Mit der Beleuchtung durch den Reaktorboden ist die beleuchtete Fläche fest definiert und kann in diesem System nicht geändert werden. Durch die Variation des Volumens im Bioreaktor kann jedoch das Oberfläche-Volumenverhältnis angepasst werden. Ein geringeres Volumen führt zu einem größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis, welches wiederum einen besseren Lichteintrag zur Folge hat. Dies ist Voraussetzung, um ein exponentielles Wachstum der Algenkultur zu ermöglichen. Allerdings kann die Pipettier-nadel nur bis zu einer bestimmten, technisch bedingten Höhe (27 mm ab Reaktorboden) in den Bioreaktor einfahren, was ein minimales Füllvolumen von 8 mL für eine Probenahme voraussetzt. Die Probenahme und der anschließende Ausgleich des Volumens

führt außerdem zu einem Verdünnungseffekt, der bei kleinen Volumen stärker ins Gewicht fällt. Ein verändertes Volumen wird ebenfalls Auswirkungen auf die wirkenden Scherkräfte haben. Der Zusammenhang zwischen Rührorgan, Volumen und entsprechender Füllhöhe ist in Tabelle 1 festgehalten.

Tab. 1: Volumen und Füllhöhe in miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren. Der Boden des Bioreaktors hat eine Dicke von 2 mm. Die Schichtdicke entspricht also Füllstand minus zwei Millimeter. Ebenfalls wichtig ist die niedrigste Eintauchtiefe der Pipettiernadeln von 27 mm. Damit ist erst ein Volumen von 8 mL oder größer umsetzbar.

| Volumen, mL | Füllstand ohne Rührer, mm | Füllstand mit S-Rührer und Vollachse, mm | Füllstand mit Paddelrührer und Vollachse, mm |
|-------------|---------------------------|--|--|
| 7 | 23 | 27 | 28 |
| 8 | 26 | 31 | 30 |
| 9 | 30 | 35 | 33 |
| 10 | 33 | 37 | 37 |
| 11 | 36 | 40 | 40 |
| 12 | 39 | 44 | 44 |
| 13 | 42 | 47 | 47 |

Ein Volumen von 10 mL wurde ausgewählt, um reproduzierbares und exponentielles Wachstum von Mikroalgen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren zu ermöglichen.

4.4.5. Kultivierungsprotokoll

Vorkulturen mit einer OD_{750} von ~ 2 wurden mit ASW-Medium verdünnt, um eine OD_{750} von $\sim 0,5$ zu erhalten. Die Zellsuspension wurde dann in die parallelen Rührkessel-Bioreaktoren mit einem Volumen von je 10 mL verteilt. Die Rührkessel-Bioreaktoreinheit im mL-Maßstab wurde in einen Pipettierroboter für die automatische OD- und pH-Messung (siehe 4.8 und 4.6), die pH-Korrektur, den Füllstandsausgleich (siehe 4.5) und das Freihalten der Pipettieröffnungen platziert. Die Mikroalgen-Zellsuspension wurde mit magnetisch induzierten S-Rührern bei 500 U min^{-1} gerührt (siehe 4.4.4). Das Rühren wurde automatisch für die Probenahme und die Füllstandsmessung gestoppt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} Druckluft mit 2 % CO_2 durchspült. Die Kopfraumkühlung der parallelen Bioreaktoren wurde auf $14 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt.

Für Kultivierungen von Mikroalgen bei konstanter Beleuchtung wurde die Kultivierungstemperatur auf konstante $29 \text{ }^\circ\text{C}$ für *M. salina* und 30°C für *S. ovalternus* eingestellt. Bei

Kultivierungen, die auf Tag- und Nachtzyklen der Lichtintensität und Temperatur untersucht wurden, verwendete man die Wetterdaten eines Sommertages im Juni 2012 in Almeria, Spanien. Diese wurde täglich wiederholend abgespielt. Der Ort der Wetteraufzeichnung stellte sich als ein idealer Referenzstandort für die Mikroalgenkultivierung im Freien dar. Die Küstenstadt Almeria, Südspanien hat eine hohe Sonneneinstrahlung, warme Lufttemperatur und gute Infrastruktur (Apel et al., 2017). Die Lichtintensität wurde für die Kultivierung alle zehn Minuten automatisch auf die Wetterdaten angepasst. Die Temperaturen aller parallelen Bioreaktoren wurden, entsprechend der Lufttemperatur aus den Wetterdaten, automatisch mit einer Abtastzeit von 1 h angepasst. Aus den gewählten Abtastzeiten ergeben sich Stufenfunktionen, welche die für die Kultivierungen tatsächlich eingestellten Werte darstellen. Diese Stufenfunktionen und Wetterdaten sind in Abb. 13 dargestellt. Die eingestellten Werte für die Temperatur während Kultivierungen mit Tag- und Nachtzyklen sind ebenfalls im Anhang in Tabelle A. 5 festgehalten.

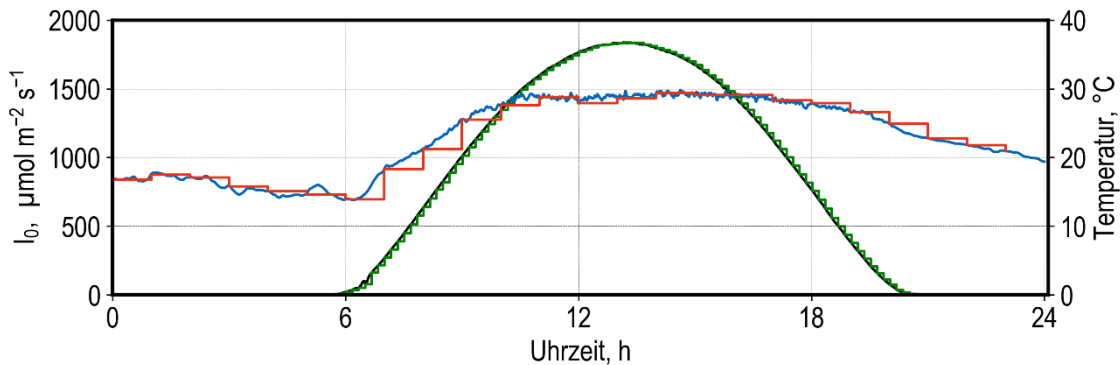


Abb. 13: Darstellung der Lichtintensität I_0 und der Lufttemperatur eines Sommertages im Juni 2012 in Almeria, Spanien. Die Temperatur aus den Wetterdaten (blau) wird durch eine Stufenfunktion (rot) in der Kultivierung umgesetzt. Die Lichtintensität aus den Wetterdaten (schwarz) wird durch eine Stufenfunktion (grün) in der Kultivierung umgesetzt.

4.5. Füllstandsausgleich in parallelen Rührkesselbioreaktoren

Durch die Begasung der Bioreaktoren entsteht eine kontinuierliche Verdunstung. Der Pipettierroboter führt stündlich eine positionsspezifische Prüfung und Ausgleich des Flüssigkeitsstands in allen parallelen Bioreaktoren durch.

Die Pipettierkanäle bewegen sich dafür in die Bioreaktoren auf eine definierte Höhe, die dem Flüssigkeitsstand des vorgesehenen Volumens entspricht. Der Flüssigkeitsstand kann aus Tabelle 1 abgelesen werden. Pipettierroboter, die auf der Hamilton Star Plattform basieren, können für jeden Pipettiervorgang eine Druckkurve aufzeichnen, sofern dies in der Flüssigkeitsklasse aktiviert ist. Die Flüssigkeitsklasse wird im Methodeneditor

(vergleiche hierzu Kapitel 4.4.2) definiert und bestimmt wie Flüssigkeiten aus der jeweiligen Klasse pipettiert werden. Der Pipettierroboter führt einen Aspirier- und Dispensierschritt von 300 μL durch und zeichnet den Verlauf des Drucks beim Aspirieren im Pipettierkanal auf. Die Druckkurve weist unterschiedliche Verläufe auf, je nachdem, ob Gas- oder Flüssigkeit aspiriert wurde (siehe Abb. 14). Beim Ansaugen der flüssigen Phase entsteht im Inneren der Nadel ein Vakuum, sodass die Druckkurve durch eine logarithmische Form beschrieben werden kann. Sobald der Pipettierkolben stoppt, steigt der Druck wieder an (Abb. 14a). Wird Luft angesaugt, sollte kein Druckabfall aufgezeichnet werden. Durch das regelmäßige Waschen der Nadeln verbleiben allerdings Rückstände des Spülwassers. Diese führen zu kleinen Ausschlägen in der aufgezeichneten Druckdynamik (Abb. 14b). Die Druckdynamik wird mit einer Spline-Funktion (Python-Funktion: `scipy univariate spline`) approximiert, deren Ableitung auf Nullstellen untersucht wird. Wenn es mehr Nullen als den Schwellenwert von 20 gibt, wird die Phase als Gas (Luft) eingestuft, der Algorithmus gibt eine (0) aus und ein definiertes Volumen von 150 μL H_2O wird zu dem Bioreaktor hinzugefügt. Andersfalls erkennt der Algorithmus Flüssigkeit, gibt eine (1) aus und das Skript für die Kultivierung fährt fort.

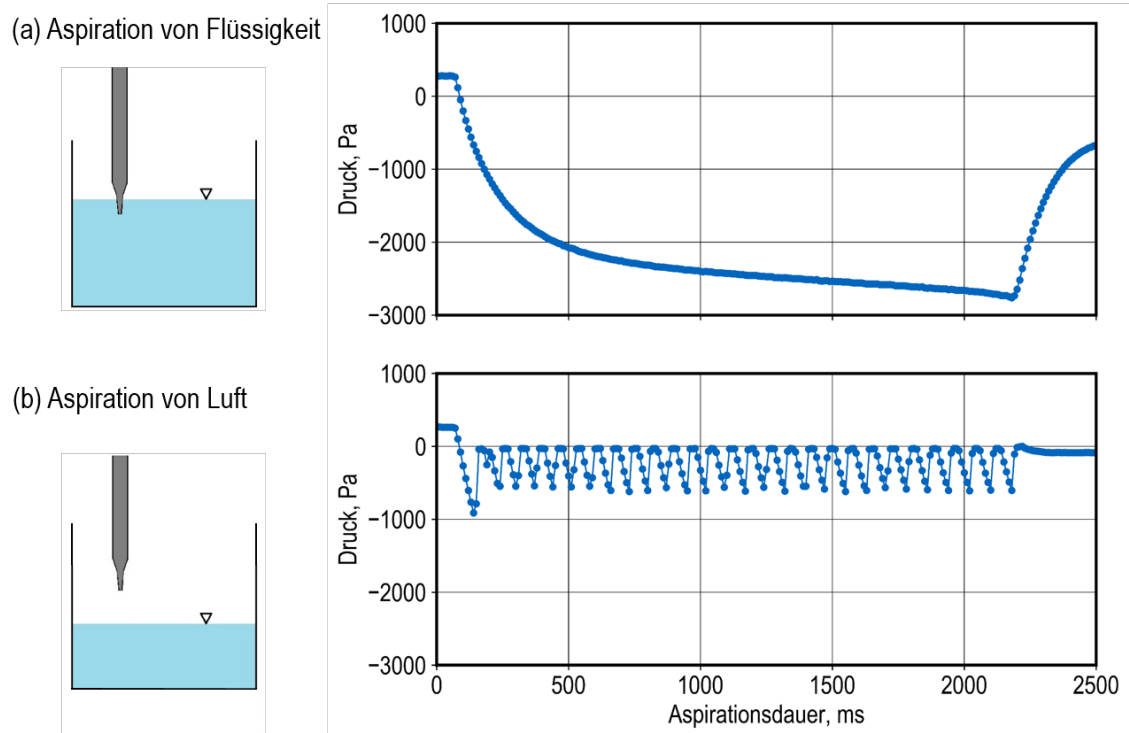


Abb. 14: Typische Druckdynamik in den Nadeln des Pipettierroboters während eines Aspirations-schrittes mit einer Dauer von 2200 ms und anschließendem Dispensierschritt: (a) Nadel in flüssiger Phase (Wasser) und (b) Nadel in Gasphase (Luft). Beide Druckdynamiken wurden mit Stahlnadeln aufgezeichnet, die kurz vor der Verwendung automatisch gewaschen wurden.

Validierung: Die Methode zum Füllstandsausgleich wurde validiert und auf ihren Fehler untersucht. Dafür wurde ein Behälter im Deep-Well-Format auf dem Roboterdeck platziert und mit Wasser befüllt. Die Pipettieradel führten dann auf unterschiedlichen Höhen Aspirationen durch. Wenn der Algorithmus Wasser detektiert gibt dieser für die jeweilige Position eine (1) aus, ansonsten eine (0). Die kumulierte Ausgaben des Algorithmus aus den acht Pipettierkanäle bei unterschiedlichen Höhen ist in Abb. 15 dargestellt.

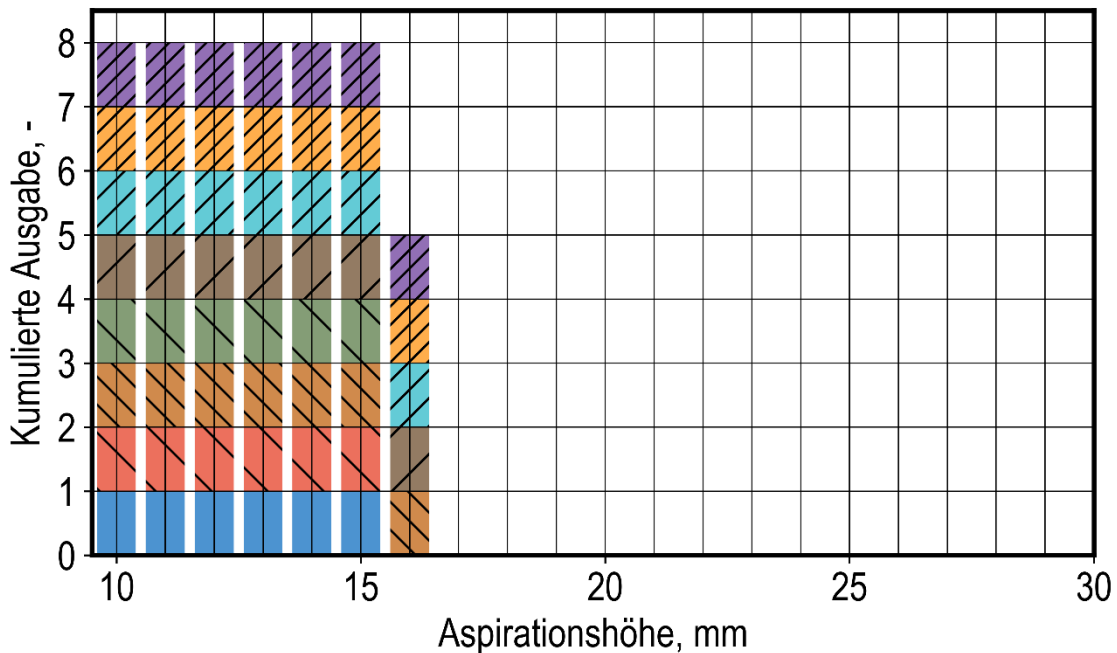


Abb. 15: Die Ausgabe sind die kumulierten Werte des Algorithmus aus den Druckkurven der acht Pipettierkanäle. Daraus ergibt sich ein Minimum von (0) und ein Maximum von (8) für die kumulierte Ausgabe. Die Höhe entspricht der für die Aspiration definierten Höhe.

Der Algorithmus ist nachweislich in der Lage, zwischen Luft und Flüssigkeit zu unterscheiden. Bei kleiner oder gleich 15 mm Höhe geben alle 8 Positionen das Signal für Flüssigkeit (1) aus. Ab 17 mm zeigen alle Positionen die Ausgabe für Luft (0) an. Bei 16 mm Höhe zeigen jedoch nur 5 von 8 Positionen Flüssigkeit an. Da es sich hierbei um einen einzigen Behälter handelt, sollten alle acht Kanäle immer das gleiche Signal ausgeben. Dies zeigt, dass mit den gewählten Einstellungen der Aspiration und der Entscheidungskriterien im Algorithmus eine Ungenauigkeit bei der Detektion von einem Millimeter auftritt.

Erläuterung: Während einer Kultivierung ist es essenziell, dass die Kopfraumkühlung des Bioreaktorsystems so gewählt wird, dass netto Verdunstung in allen Positionen auftritt. Bei zu starker Kopfraumkühlung würde durch die befeuchtete Luft der Begasung

mehr Wasser in den Bioreaktoren kondensieren als ausgetragen wird und so der Füllstand steigen. Dieser Umstand kann von der Füllstandserkennung nicht ausgeglichen werden. Dies wäre auch nicht erwünscht, da bei der Entfernung von Flüssigkeit auch Zellen entnommen werden würden.

Wie zuvor in Kapitel 4.4.3 beschrieben, können durch den stündlichen Pipettiervorgang zur Korrektur des Flüssigkeitsstands außerdem Wassertropfen, die sich in der Pipettieröffnung der Gasversorgungsabdeckung der parallelen Bioreaktoreinheit bilden, zurück in die Reaktionskammer gedrückt werden.

4.6. At-line pH-Messung

Der pH wurde mit einer 96-Well-MTP mit integrierten chemisch-optischen pH-Sensoren bestimmt (HydroPlate HP96U, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland). Diese wurde von einem Standard Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer (Synergy HTX, Multimode-Reader, Biotek, Winooski, VT, USA) ausgelesen. Die pH-Sensoren enthielten zwei verschiedene Farbstoffe. Das Fluoreszenzsignal des pH-Indikatorfarbstoffs ($I_{indicator}$) wurde bei 538 nm nach Anregung bei 485 nm gemessen, während das Fluoreszenzsignal des nicht-pH-sensitiven Referenzfarbstoffs ($I_{reference}$) bei 620 nm nach Anregung bei 485 nm gemessen wurde. Der Quotient der Intensitätssignale der beiden Fluoreszenzfarbstoffe stellt das Intensitätsverhältnis I_R dar (Gleichung (8)):

$$I_R = \frac{I_{indicator}}{I_{reference}} \quad (8)$$

Die Korrelation von I_R zu pH wurde vor der Kultivierung mit einer HydroPlate aus der gleichen Charge bestimmt. Diese Referenz-Hydroplatte wurde in dreifacher Ausführung mit Medium mit unterschiedlichen pH gefüllt. Das Intensitätsverhältnis I_R und der pH wurden mit Gleichung (9) korreliert, um die Korrelationsmodellparameter I_{max} , I_{min} , pH_0 und dpH zu schätzen. Die Parameter wurde mit der Software pH_solvert10 (PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) bestimmt.

$$I_R = \frac{I_{min} - I_{max}}{1 + e^{\frac{pH - pH_0}{dpH}}} + I_{max} \quad (9)$$

In Abb. 16 sind die Korrelationen für ASW- und BG11-Medium dargestellt.

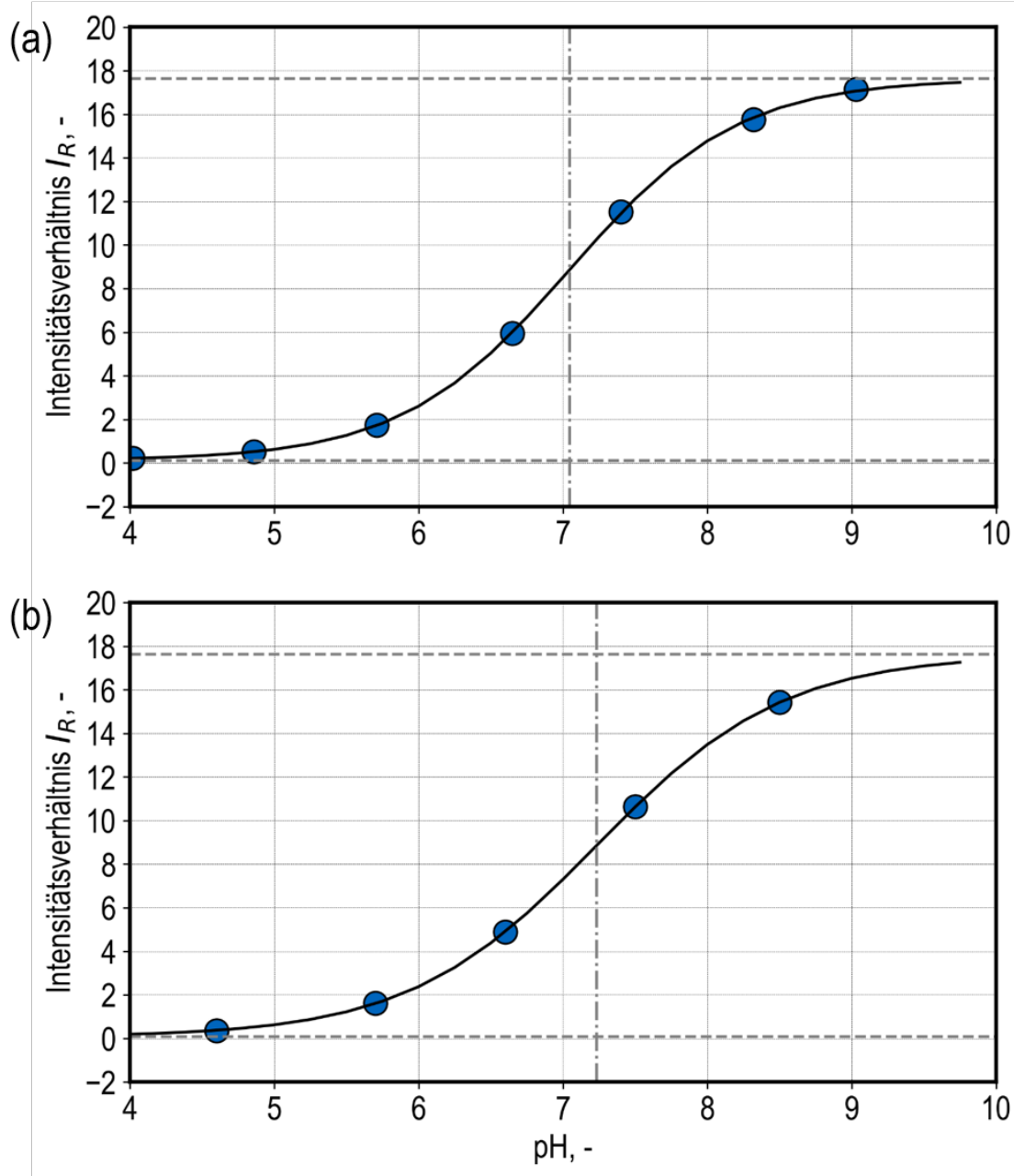


Abb. 16: Kalibrierungskurve einer MTP mit integrierten chemisch-optischen pH-Sensoren (Intensitätsverhältnis I_R als Funktion des pH). Die Sensoren werden von unten mit einem Fluoreszenzphotometer mit Wellenlängen von 485 / 540 nm und 485 / 620 nm abgelesen. I_R wurde in dreifacher Ausführung gemessen (Standardabweichung < 1%). Die Kalibrierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Korrelationsparameter für ASW wurden identifiziert mit: $I_{min} = 0,115$; $I_{max} = 17,635$; $pH_0 = 7,048$; $dpH = 0,582$ und für BG-11 mit: $I_{min} = 0,067$; $I_{max} = 17,62$; $pH_0 = 7,232$; $dpH = 0,652$. I_{min} und I_{max} stellen die horizontalen Asymptoten der sigmoidalen Kalibrierkurve dar (--), pH_0 ist der Wendepunkt (-.), und dpH beeinflusst die Kurvenbreite.

Die OD- und pH-Messungen wurden während der Kultivierung miteinander gekoppelt, um das benötigte Probenvolumen zu reduzieren. Nach der seriellen Verdünnung für die OD-Messung verblieben 202 μ L unverdünnte Zellsuspension in der HydroPlate. Nach

der Inkubation gab das MTP-Photometer einen Wert I_R aus, der basierend auf der Korrelation in pH übersetzt wurde. Wenn der gemessene pH unter 7,7 oder über 8,3 lag, wurde während der Kultivierung entweder 45 μL Base (0,5 M NaOH) oder 45 μL Säure (0,5 M HCl) in den jeweiligen Bioreaktor durch den Pipettierroboter zugegeben.

Kultivierungen mit simulierten Tag- und Nachtzyklen der einfallenden Lichtintensitäten und Temperatur wurden ohne automatisierte pH-Kontrolle durchgeführt. Fiel der pH während des Satzprozesses von *M. salina* unter pH 7,5, wurden 45 μL 0,5 M NaOH manuell zugegeben.

4.6.1. Inkubationszeit

Die Inkubationszeit der pH-Sensoren wurde auf konstante Messwerte überprüft. Für einen automatisierten Prozess müssen Inkubationszeiten genau definiert werden und Messungen verlässlich durchgeführt werden, da eine manuelle Kontrolle während des Arbeitsschritts nicht möglich ist. ASW-Medium mit unterschiedlichem pH wurde alle 5 min gemessen und ist in Abb. 17 dargestellt.

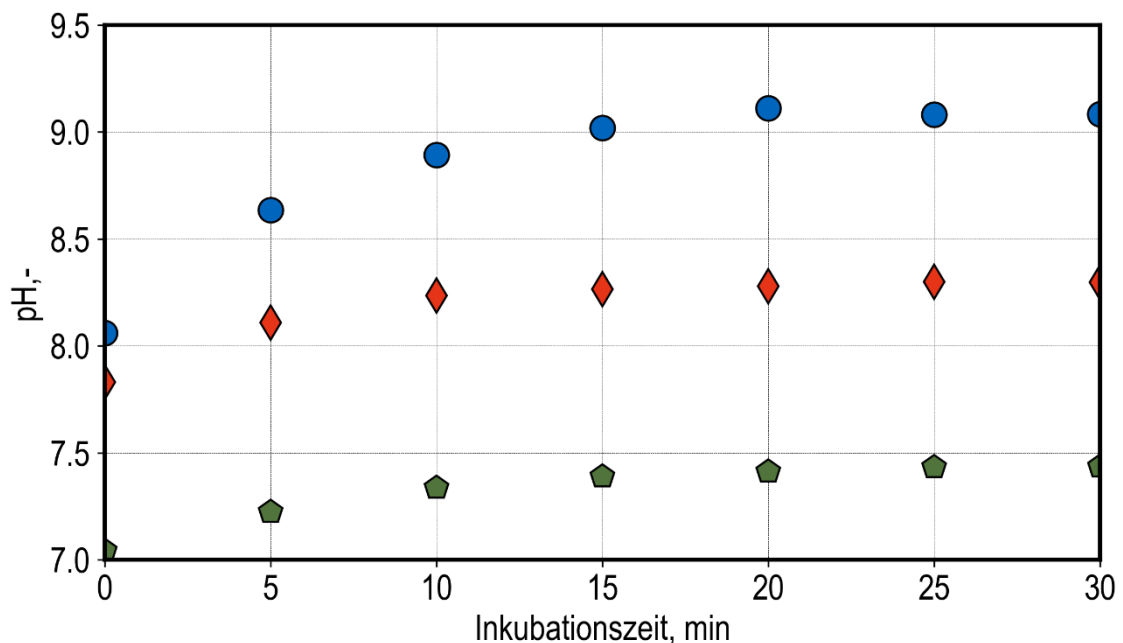


Abb. 17: Bestimmung der optimalen Inkubationszeit in einer HydroPlate bei pH 7,40 \blacklozenge ; pH 8,32 \blacklozenge und pH 9,03 \bullet . Der Messwert I_R wird anhand der vorher bestimmten Kalibrierung in pH übersetzt.

Der anfängliche pH der Lösungen lag bei allen Messungen unterhalb des extern gemessenen, tatsächlichen Wertes: pH 7,0 für die Lösung mit pH 7,40, pH 7,83 für die Lösung mit pH 8,32 und pH 8,06 für die Lösung mit pH 9,03. Nach den ersten 5 Minuten ist ein

Anstieg des gemessenen pH auf pH 7,22, pH 8,11 und pH 8,63 für die Lösungen mit einem pH 7,40, pH 8,32 und pH 9,03 festzustellen. Nach 10 min flacht der Anstieg ab, doch erst nach 20 Minuten bleiben die Werte konstant.

Die Daten zeigen, dass eine unmittelbare Messung nach dem Pipettieren sowie Messungen bis zur 15-Minuten-Marke nicht optimal sind, da die gemessenen Werte weit von dem tatsächlichen pH der Lösungen entfernt sind. Die Inkubationszeit in der Roboter-methode wurde auf mindestens 15 min eingestellt. Darauf folgt eine dreiminütige Aufheizphase des Photometers, sodass mindestens 18 min Inkubationszeit vor der Messung garantiert sind.

4.6.2. Langzeitstabilität

Die Kultivierung von *M. salina* in den parallelen miniaturisierten PBR dauert in der Regel etwa 7 – 10 Tage. Die HydroPlate, die für die Messung des pH während dieses Prozesses verwendet wird, wird von dem Hersteller jedoch als lichtempfindlich beschrieben. Da der Prozess im Idealfall vollautomatisiert abläuft und die dabei verwendete MTP auch gespült werden können, wurde die Genauigkeit einer einzelnen Hydroplatte über acht Kultivierungstage hinweg untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei ASW-Lösungen mit pH innerhalb des optimalen pH-Bereichs für die Kultivierung von *M. salina* (Safafar et al., 2016) verwendet und in dreifacher Ausführung gemessen. Die drei Lösungen mit pH 8,53, pH 8,05 und pH 7,57 wurden acht Tage hintereinander in derselben Hydroplatte gemessen, die gleichzeitig für die Kultivierung von *M. salina* verwendet wurde. Wie im vorangegangenen Versuch wurden für die Lösungen im gesamten Test dieselben Vertiefungen verwendet und die Messungen in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Messungen sind in Abb. 18 dargestellt.

Der pH, der nach einem Tag Kultivierung gemessen wurde, entsprach in etwa den zu Beginn extern gemessenen Werten der Lösungen. In den ersten vier Tagen wurde eine leichte Absenkung des pH beobachtet, wobei diese Werte für die Lösungen mit dem höchsten pH am deutlichsten abnahmen. Am siebten Tag zeigten die Messungen einen leichten Anstieg im Vergleich zum vorherigen Messwert. Die Änderung der Messungen fällt nach Tag 4 generell weniger stark aus. Die Änderung des gemessenen pH der drei Lösungen betrug zwischen Tag 1 und Tag 8: $\Delta\text{pH } 0,04$; $\Delta\text{pH } 0,05$ und $\Delta\text{pH } 0,12$. Eine Änderung des gemessenen pH, die kleiner als pH 0,4 ausfällt ist für Photoautotrophe Kultivierungen unproblematisch, da der Toleranzbereich von Mikroalgen deutlich größer ausfällt. Der pH Ausgleich wurde bei Abweichungen größer als $\Delta\text{pH } 0,3$ (bei späteren Kultivierungen auch ab $\Delta\text{pH } 0,2$) automatisiert ausgeführt.

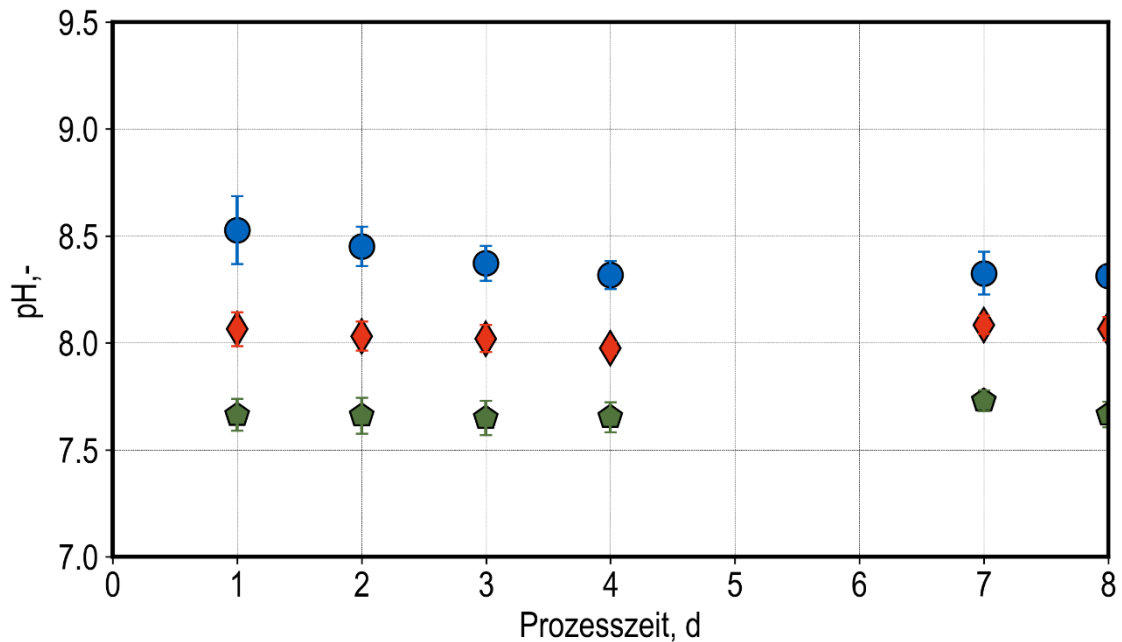


Abb. 18: Langzeitstabilität der pH-Sensoren während einer photoautotrophen Kultivierung. Die HydroPlate wurde täglich in einem Photometer gemessen und anschließend gespült. Auf 3 x 3 Positionen, die nicht für die Kultivierung benötigt wurden, wurde täglich vor der Messung Medium mit definierten pH gegeben: pH 7,57 ◆; pH 8,05 ◆ und pH 8,53 ●. An den Tagen ohne Prüfung des pH wurde die HydroPlate dennoch für die Messung der OD und pH der Zellsuspensionen verwendet.

4.7. Kultivierung in Flachplatten PBR

Die beiden Mikroalgenstämme wurden in Flachplatten-PBR (Labfors 5 LUX, Infors HT, Bottmingen) mit einem Arbeitsvolumen von 1,8 L kultiviert. Vorkulturen mit einer $OD_{750} \sim 2$ wurden mit ASW-Medium (bei *M. salina*) oder BG-11-Medium (bei *S. ovalternus*) auf $OD_{750} 0,2$ verdünnt. Der Versuchsaufbau des Flachplatten-PBR ist in Abb. 19 dargestellt.

Drei Rahmen aus rostfreiem Stahl halten drei voneinander getrennte 5,5 mm dicke Borosilikatglasplatten, die zwei Kammern bilden. Die dem Licht abgewandte Seite ist die Temperierkammer. Sie hat drei Anschlüsse (Einlass, Auslass, Überlauf), durch die Wasser zur Temperierung der Kultivierungskammer fließt. Für *M. salina* wurde die Temperaturregelung auf 29°C eingestellt, für *S. ovalternus* auf 30°C. Die Kultivierungskammer befindet sich auf der LED-Panel zugewandten Seite und hat eine Schichtdicke von 2 cm. In dieser Kammer befindet sich das horizontale Belüftungsrohr, durch das das Gasgemisch in den Bioreaktor strömt und ein vertikales Strömungsleitblech. Der PBR wurde mit einer konstanten Begasungsrate von 2 L min^{-1} Druckluft mit 2 % CO_2 betrieben. Die Luft wurde vor dem Eintritt in den PBR befeuchtet. Druckluft, unverbrauchtes CO_2 und gebildetes O_2 werden durch den Abgaskühler abgeleitet.

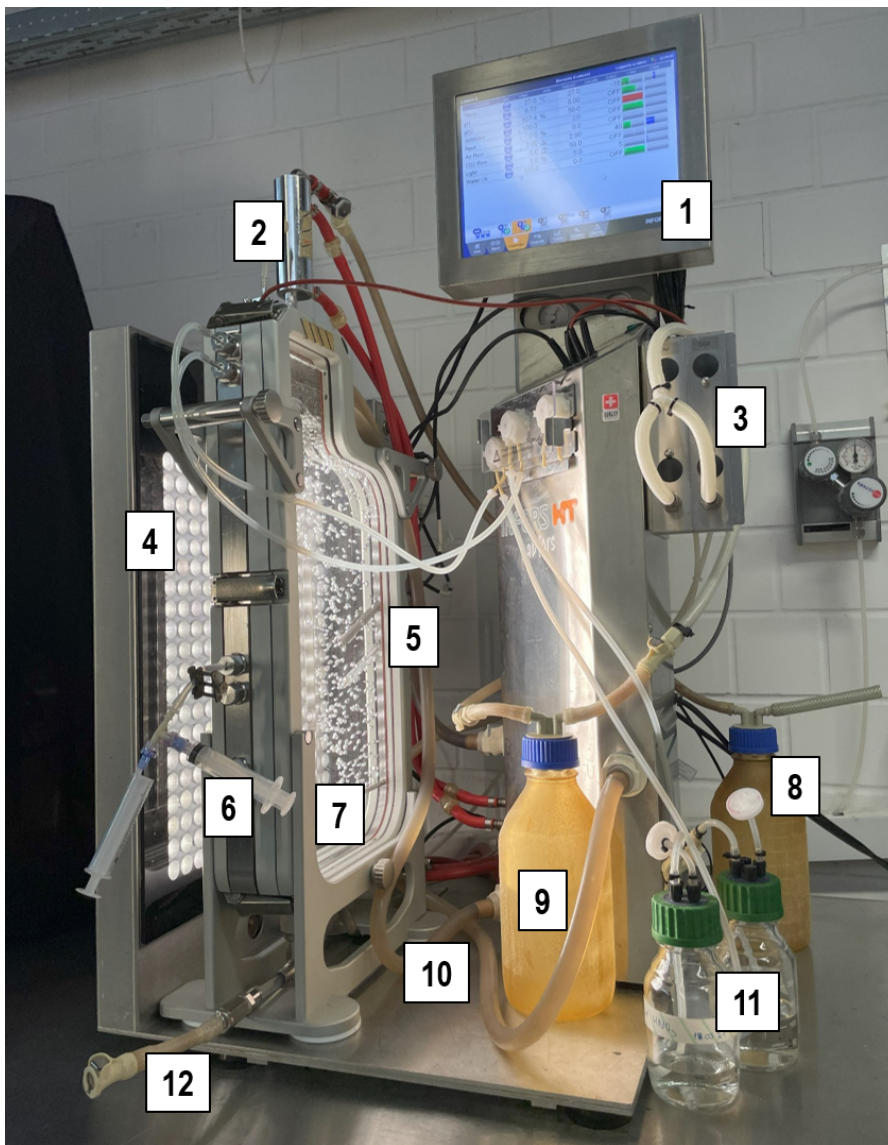


Abb. 19: Versuchsaufbau der Mikroalgenkultivierung für Satzprozesse im Flachplatten-photobioreaktor; 1 - Bedieneinheit, 2 - Abgaskühler, 3 - Massendurchflussregler, 4 - LED-Panel, 5 - pO_2 - und pH-Sonde, 6 - Probenahmesystem, 7 - Kultivierungs- und Temperierkammer, 8 - Schaumfalle, 9 - Begasungsbefeuchtungsf flasche, 10 - Anschlüsse der Temperierkammer, 11 - Vorlagebehälter für Säure und Base, 12 - Ablassschlauch

Eine pO_2 -Sonde und eine pH-Sonde (Easyferm Plus ARC und VisiFerm DO ECS 120 H0, Hamilton Germany GmbH, Gräfelfing, Deutschland) sind ebenfalls in der Kultivierungskammer angebracht. Die pO_2 -Sonde wurde durch Begasung des Bioreaktors mit Stickstoff (0 %) und mit Druckluft (100 %) linear kalibriert. Die pH-Sonde wurde bei pH 4,0 und pH 10,0 linear kalibriert. Liegt der pH außerhalb von pH 7,9 – pH 8,1, wurde dieserr durch Zugabe von Säure (0,6 M HNO_3) oder Base (3 M $NaOH$) automatisiert angepasst. Die Lösungen wurde in Vorratsbehältern neben dem PBR positioniert und wurden über peristaltische Pumpen und Nadeln von oben in die Kulturkammer getropft.

Das LED-Panel, das aus 260 Hochleistungs-LEDs besteht und eine Fläche von 0,09 m² beleuchtet, wurde auf den gewünschten Wert zwischen 50 – 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestellt. Die Steuerung und Überwachung der verschiedenen Prozessvariablen erfolgte über die Software Iris V6.0 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz).

4.8. At-line Messung der optischen Dichte und Korrelationen

Während den Kultivierungen in parallelen Rührkessel-PBR entnahm der Pipettierroboter (Microlab STARlet, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) wiederholend 250 μL der Zellsuspension und führte 1:5- und 1:25-Verdünnungen in einer 96-Well-MTP (klarer, flacher Boden) durch. Die *M. salina* Suspension wurden mit Salzlösung (27 g L⁻¹ NaCl) und *S. ovalternus* mit BG-11 Medium verdünnt. Die OD₇₅₀ wurden automatisch mit einem MTP-Photometer gemessen (Synergy HTX, Multimode-Reader, Biotek, Winooski, VT, USA).

Bei Kultivierungen in Flachplatten-PBR und für Vorkulturen in Blasensäulen-PBR wurden die Proben manuell entnommen und bei 750 nm mit einem Küvettenphotometer (Genesys 10S UVVis, Thermo Fisher, Waltham) zur Bestimmung der OD gemessen. Die Proben wurden mit 27 g L⁻¹ NaCl (*M. salina*) oder mit BG-11 Medium (*S. ovalternus*) verdünnt.

Um einen besseren Vergleich zwischen OD₇₅₀ in Vorkulturen und Rührkessel-PBR zu ermöglichen, wurde eine OD₇₅₀-Korrelation zwischen den MTP- und Küvettenphotometer erstellt. Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten entweder direkt gemessene oder korrelierte Küvetten-OD₇₅₀. Die OD-Messung bei 750 nm ist eine etablierte Methode zur Wachstumsüberwachung von Mikroalgen (Koller, Löwe, et al., 2017; Schädler et al., 2021; Thurn et al., 2022).

4.9. Bestimmung der exponentiellen Wachstumsrate basierend auf OD

Um die exponentielle Wachstumsphase zu bestimmen, wurde der lineare Anstieg in einer halblogarithmischen Darstellung der OD₇₅₀ über die Prozesszeit berücksichtigt. Die spezifische Wachstumsrate wurde unter Verwendung einer exponentiellen Regression ausschließlich während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt.

4.10. Messung der Lichtintensität

Zur Auslegung photoautotropher Prozesse und PBR ist die Sicherstellung der Lichtintensität essenziell. Dafür werden an verschiedenen Positionen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Lichtmessungen durchgeführt. Alle Messungen der Lichtintensität wurden mit einem Miniaturspektrometer (FLAME, Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland) gemessen. Mit der Software Ocean View (Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland) wurden dabei 250 sequenzielle Messungen aufgezeichnet und anschließend ein Durchschnittswert berechnet.

4.10.1. Eingangspotonenflussdichte I_0

Die Eingangspotonenflussdichte entspricht der auf den PBR treffenden Lichtintensität. Für die miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren wurde der Sensorkopf mit einer 3D-gedruckten Halterung senkrecht zur Lichtquelle positioniert (Abb. A1). Die einfallende Lichtintensität wurde im Wellenlängenbereich von 400 – 700 nm aufgezeichnet. Die Lichtintensität, welche in $W\ m^{-2}$ gemessen wird, soll in späteren Messungen und Berechnungen als Photonenflussdichte in $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$ angegeben werden. Die Energie eines Photons ist abhängig von der Wellenlänge λ und somit ist der Korrelationsfaktor für diese Umrechnung abhängig vom jeweiligen Spektrum der Lichtquelle. Die Photonenenergie pro Mol ergibt sich aus:

$$E = N_A * h * \frac{c}{\lambda} \quad (10)$$

| | | |
|-----|-----------|---|
| Mit | E | Energie pro Mol Photonen, $J\ mol^{-1}$ |
| | N_A | Avogadrokonstante, mol^{-1} |
| | h | Wirkungsquantum, Js |
| | c | Lichtgeschwindigkeit, $m\ s^{-1}$ |
| | λ | Wellenlänge, nm |

Die Photonenflussdichte ergibt sich aus dem Quotient der Lichtintensität I bei einer definierten Wellenlänge durch die Energie pro Mol Photonen bei dieser Wellenlänge und ist in Gleichung (11) dargestellt. Die empirischen Messungen der Lichtintensität I ($W\ m^{-2}$) geben diskrete Werte für jede Wellenlänge aus.

$$PFD = \frac{I(\lambda_i)}{E(\lambda_i)} \quad (11)$$

| | | |
|-----|-------|--|
| Mit | PFD | Photonenflussdichte, $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$ |
|-----|-------|--|

| | |
|-------------|---|
| I | Lichtintensität, W m^{-2} |
| E | Energie pro Mol Photonen, J mol^{-1} |
| λ_i | Wellenlänge in diskreten Abschnitten, nm |

Nachdem für jede Wellenlänge zwischen 400 und 700 nm eines definierten Spektrums die Photonenflussdichte berechnet wurde, kann ein Korrelationsfaktor k nach Gleichung (12) bestimmt werden.

$$k = \frac{\sum_i \frac{I(\lambda_i)}{E(\lambda_i)}}{\sum_i I(\lambda_i)} \quad (12)$$

| | | |
|-----|-------------|--|
| Mit | k | Korrelationsfaktor, $\mu\text{mol W}^{-1} \text{s}^{-1}$ |
| | I | Lichtintensität, W m^{-2} |
| | E | Energie pro Mol Photonen, J mol^{-1} |
| | λ_i | Wellenlänge in diskreten Abschnitten, nm |

Basierend auf dem Spektrum wurde für das Beleuchtungsmodul ein Korrelationsfaktor von $4,64 \mu\text{mol W}^{-1} \text{s}^{-1}$ für alle weiteren Umrechnungen verwendet.

Für die Bestimmung der Eingangspotonenflussdichte des Flachplatten-PBR wurde dieser nur mit der ersten LED-Panel zugewandten Glasscheibe aufgebaut. An dieser Glasscheibe wurde an vier Positionen, die über die beleuchtete Fläche verteilt sind, die Lichtintensitäten gemessen. Der Korrelationsfaktor für den verwendeten Flachplatten PBR beträgt 4,85. Für das Spektrum des Sonnenlichts (ASTM G173-03, abgeleitet aus SMARTS v. 2.9.2 (NREL, 2003)) wurde zum Vergleich ein Korrelationsfaktor von 4,55 bestimmt.

4.10.2. Transmissionsmessung mit miniaturisierten Rührkessel-PBR (offline)

Transmissionsmessungen von Mikroalgensuspensionen, die in den miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren kultiviert wurden, konnten wegen des begrenzten Platzes in der Bioreaktoreinheit nur offline durchgeführt werden, da die Positionierung des Lichtsensors während der Kultivierung nicht möglich war. Am Ende des Prozesses wurde die Zellsuspension eines Bioreaktors jeder Prozessbedingung daher mit dem jeweiligen Medium auf fünf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt. Ein Volumen von 10 mL verdünnter Zellsuspension wurde in eine umgebaute Bioreaktoreinheit pipettiert

(Abb. 20). Die Kopfraumkühlung und der Deckel wurden entfernt und ein Polystyrol-Bioreaktor wurde auf 48 cm Länge zugeschnitten, so dass 10 mL Zellsuspension, die einer Schichtdicke von 32 mm entspricht, hineinpassen und ein Lichtsensor darüber angebracht werden konnte.

Der Lichtsensor wurde senkrecht zur Lichtquelle mit einer Lichtsensorhalterung (Abb. A4) auf den Bioreaktor gesteckt und die Transmission durch Algensuspensionen mit unterschiedlichen OD_{750} gemessen. Die Eingangs-Photonenflussdichte I_0 wurde entsprechend den vorherigen Kultivierungsbedingungen gewählt.

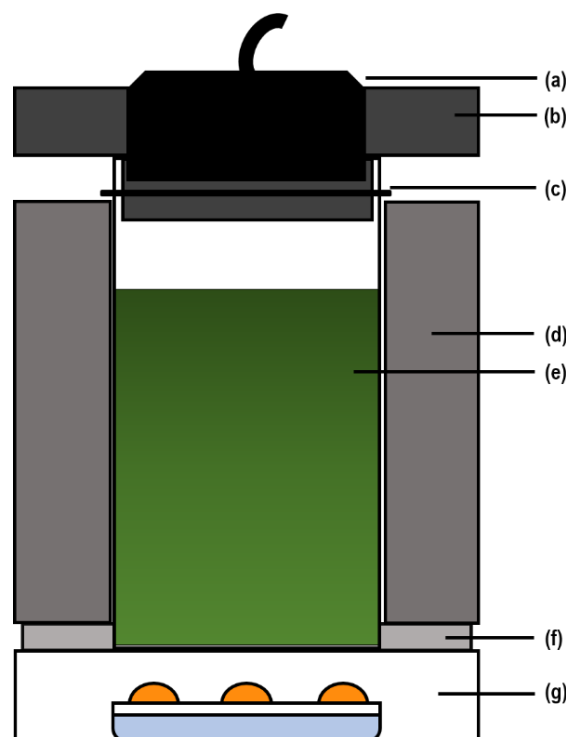


Abb. 20: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Transmissionsmessung in einem Rührkessel-PBR. (a) Mikrospektrometer, (b) Lichtsensorhalterung, (c) O-Ring, der 2,5 mm unterhalb des oberen Endes des verkürzten Bioreaktors positioniert ist und den Bioreaktor auf der vorgesehenen Höhe fixiert, (d) Wärmetauscher und Magnetspule der modifizierten Bioreaktoreinheit, (e) 10 mL verdünnte Algensuspension in einem verkürzten Bioreaktor, (f) Hall-Sensor, (g) Beleuchtungsmodul

4.10.3. Transmissionsmessung mit Flachplatten-PBR (at-line)

Die Transmissionsmessung für Kultivierungen in Flachplatten-PBR wurde während der Kultivierung (at-line) durchgeführt, indem der Sensorkopf an das Glas der lichtabgewandten Seite des PBR gehalten wurde. Die Messungen wurden täglich an vier definierten Positionen, die über die Oberfläche des PBR verteilt sind, durchgeführt.

4.11. Biotrockenmassekonzentration

In einem separaten Experiment wurden die OD_{750} und die Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt und daraus eine lineare Korrelation berechnet, um eine BTM-Konzentration auf der Grundlage der gemessenen OD_{750} zu schätzen. Die gravimetrischen Messungen der BTM-Konzentrationen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Vorgetrocknete (24 h bei 80 °C) Glasmikrofaserfilter (GF/C, Waltham, MA, USA, GE Healthcare) wurden bei Raumtemperatur gewogen. Die Filter wurden dann mit einem definierten Volumen der Mikroalgen-suspension beladen, und alle Salzreste wurden mit doppeltem Volumen deionisierten Wasser abgespült. Die beladenen Filter wurden für 48 h bei 80 °C getrocknet, bevor sie erneut bei Raumtemperatur gewogen wurden. Die BTM-Konzentration berechnet sich aus der Differenz zwischen dem unbeladenen und beladenen Filter, geteilt durch das eingesetzte Probenvolumen.

4.12. Modellierung des photoautotrophen Wachstums

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bestehende mathematische Modelle zur Lichtabschwächung und Bestimmung der mittleren integralen Photonenflussdichte adaptiert.

4.12.1. Lichtabschwächungsmodelle

Licht, das auf einen PBR einstrahlt, wird von den Mikroalgenzellen reflektiert, transmittiert und absorbiert. Mit zunehmender Schichtdicke der Suspension wird das eingestrahelte Licht weiter abgeschwächt. Zur Berechnung der Lichtintensität innerhalb eines PBR wurden Transmissionsmessungen von photoautotrophen Kulturen in Kombination mit einem Lichtabschwächungsmodell verwendet. Die Eingangsphotonenflussdichte I_0 und die entsprechende Schichtdicke L des PBR sind für die jeweilige Kultivierung spezifiziert. Zur Modellierung der Lichtabschwächung wurde das Lambert-Beer-Gesetz durch eine reaktorspezifische Absorption r modifiziert (Gl. 13). Die Zellkonzentration c_x kann anstatt der Zellzahl oder BTM-Konzentration auch mit der Optischen Dichte bei 750 nm beschrieben werden, sofern eine lineare Korrelation zwischen BTM-Konzentration und OD_{750} angenommen werden kann. Dies muss für den zu untersuchenden Stamm gezeigt werden. Die Lichtintensität I ist eine Funktion des Eingangsphotonenflussdichte I_0 , der reaktorspezifischen Absorption r , des spezifischen Extinktionskoeffizienten ε , der OD_{750} der Zellsuspension und der Schichtdicke L des PBR.

$$I = I_0 \cdot r \cdot e^{-\varepsilon \cdot OD \cdot L} \quad (13)$$

Der modifizierte Ansatz nach Lambert-Beer („Lambert-Beer- r “, Gl. 13) wurde zur Berechnung des Transmissionskoeffizienten ε und der reaktorspezifischen Absorption r verwendet. Beide Modellparameter wurden über eine Kurvenanpassung ermittelt (Python-Funktion: `scipy.optimize.curve_fit`).

4.12.2. Mittlere integrale Photonenflussdichte

Die Lichtintensität, welche die Mikroalgenkulturen erfahren, wird in dieser Arbeit mit der mittleren integralen Photonenflussdichte beschrieben. Diese wird entsprechend dem modifizierten Ansatz Lambert-Beer- r aufgebaut. Für die reaktorspezifische Absorption $r(l)$ wird eine lineare Korrelation (Gl. 14) angenommen, die in Abb. 21 dargestellt ist.

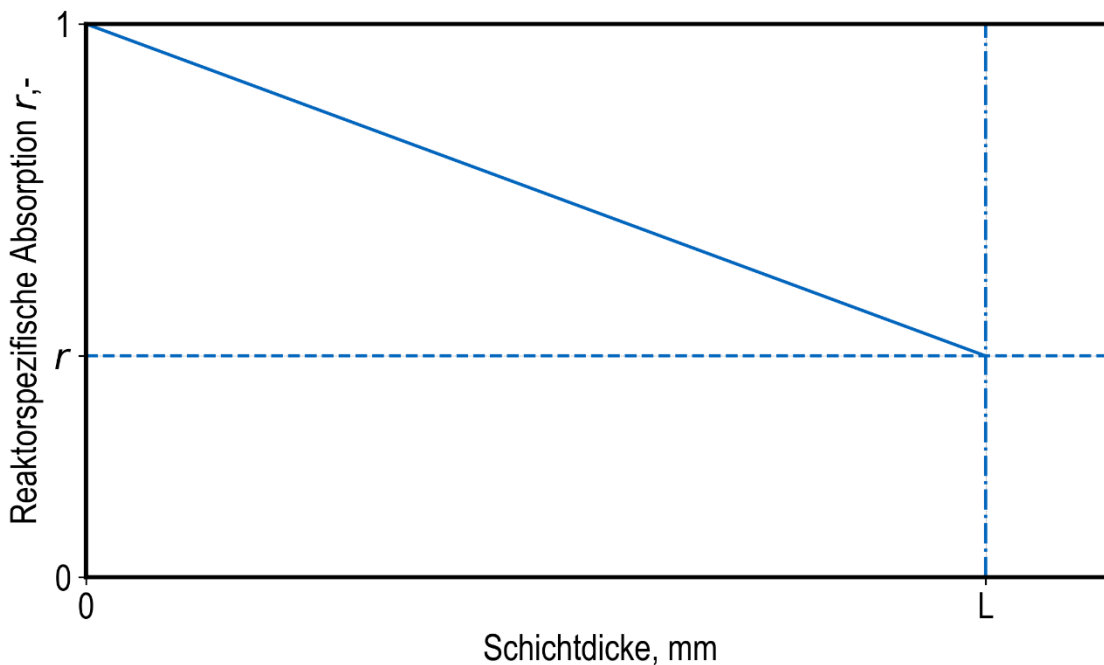


Abb. 21: Reaktorspezifische Absorption als lineare Funktion der Schichtdicke. Der Parameter r beschreibt die Absorption und Streuung von einstrahlendem Licht durch die Reaktorgeometrie. Der Wert liegt dabei immer zwischen 0 und 1. Bei Eintritt von Licht in den Bioreaktor wirkt r wenig, nimmt aber bis zur Schichtdicke des Bioreaktors L linear zu.

Die mittlere integrale Photonenflussdichte ergibt sich aus der räumlichen und zeitlichen Ableitung des modifizierten Ansatzes Lambert-Beer- r (Gl. 13) mit der Funktion $r(l)$ (Gl. 14) entsprechend dem Vorgehen wie es in Kapitel 3.3.3 beschrieben ist. Die räumliche Ableitung, also die Ableitung über die Schichtdicke des PBR, stellt I^* dar und ist in Gl. 15 beschrieben. Die zeitliche Ableitung, also die Zunahme der OD während der exponentiellen Wachstumsphase, stellt I^{**} dar und ist in Gl. 16 beschrieben.

$$r(l) = \frac{r-1}{L} * l + 1 \quad (14)$$

$$I^* = \frac{1}{L} \int_0^L I(OD, l) dl \xrightarrow{I = I_0 * r(l) * e^{-\mathcal{E} * OD * l}} \quad (15)$$

$$I^* = \frac{e^{-\mathcal{E} * OD * L} * I_0 * (1 + e^{\mathcal{E} * OD * L} (-1 + L * OD * \mathcal{E})) + (-1 + e^{\mathcal{E} * OD * L} - L * OD * \mathcal{E}) r}{L^2 * OD^2 * \mathcal{E}^2}$$

$$I^{**} = \frac{1}{\Delta t} \int_{t_a}^{t_e} I^*(OD, t) dt \quad (\Delta t = t_e - t_a)$$

$$\xrightarrow{\frac{dOD}{dt} = \mu * OD \leftrightarrow dt = \frac{dOD}{\mu * OD}} I^{**} = \frac{1}{\Delta t} \int_{OD_a}^{OD_e} (I^*(OD, t) * OD^{-1} * \mu^{-1}) dOD \quad (16)$$

$$I^{**} = I_0 \left[\frac{-r + \mathcal{E}^2 \cdot OD^2 \cdot L^2 \cdot Ei(-\mathcal{E} \cdot OD \cdot L) + r \cdot \mathcal{E}^2 \cdot OD^2 \cdot L^2 \cdot Ei(-\mathcal{E} \cdot OD \cdot L)}{2 \cdot \mathcal{E}^2 \cdot OD^2 \cdot L^2 \cdot \Delta t \cdot \mu} \right]_{OD_a}^{OD_e}$$

| | | |
|-----|---------------|--|
| Mit | I^* | mittlere integrale Photonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | L | maximale Schichtdicke der Mikroalgensuspension, m |
| | l | Schichtdicke der Mikroalgensuspension, m |
| | I_0 | Eingangspotonenflussdichte, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| | \mathcal{E} | spezifischer Extinktionskoeffizient, m^{-1} |
| | t_a, t_e | Anfang und Ende der exponentiellen Wachstumsphase, d |
| | OD_a, OD_e | OD am Anfang und Ende der exponentiellen Wachstumsphase, - |
| | μ | Spezifische Wachstumsrate, d^{-1} |
| | Ei | Integralexponentialfunktion, - |

Die optische Dichte OD_{750} wird hier alternativ für die BTM-Konzentration verwendet. Bei kleinen Volumina und automatisierten Umgebungen ist die Messung der OD praktischer umzusetzen als die Bestimmung der BTM-Konzentration. Der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ umfasst die Absorption der Pigmente und die Streuung durch die Zellen selbst. Die reaktorspezifische Absorption r beschreibt die Absorption und Streuung des PBR. Die Werte für ϵ und r wurden durch Transmissionsmessungen bestimmt. I_0 ist die einfallende Lichtintensität, die an der PBR-Oberfläche gemessen wurde. Wachstumsrate μ und Zeit Δt sind durch die exponentielle Wachstumsphase definiert.

Um die Skalierbarkeit der Kultivierungen zu überprüfen, wurde die Wachstumskinetik als Funktion der mittleren integrale Photonenflussdichte als Maßstab herangezogen. Dabei wurde I^{**} nach dem modifizierten Ansatz Lambert-Beer- r (Gl.16) verwendet. Die Parameter μ_{\max} , K_s , K_i und φ aus Gleichung (7) wurden mit der Python-Funktion `scipy.optimize.curve_fit` angepasst.

5. Gestaltung eines Beleuchtungsmoduls²

In diesem Kapitel werden die Gestaltung des Beleuchtungsmoduls für photoautotrophe Kultivierungen in miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren und die zugrundeliegenden konzeptionellen Überlegungen erläutert.

5.1. Leuchtmittel Auswahl

Um ein passendes Leuchtmittel auszuwählen, wurden mehrere weiß leuchtende LEDs auf ihre Lichtintensität und Spektrum untersucht. Als Lichtquellen für die Beleuchtungsmodul wurden weiße LEDs (Nichia NF2W757GT-F1, Nichia Corporation, Anan, Japan) mit einem breiten Spektrum ausgewählt. In Abbildung 22 wird das normierte Spektrum einer solchen LED mit dem Spektrum des Sonnenlichts sowie dem Referenz-Photobioreaktor verglichen.

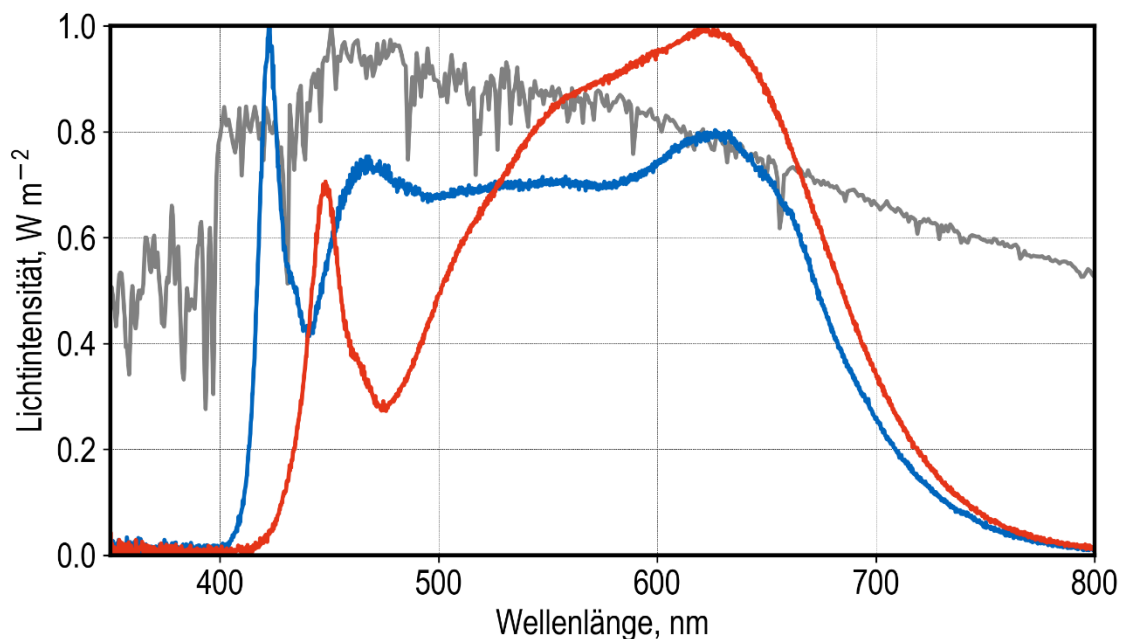


Abb. 22: Spektrum des Sonnenlichts ASTM G173-03 (grau), abgeleitet aus SMARTS v. 2.9.2 (NREL, 2003), im Vergleich zu dem Spektrums der LEDs des Beleuchtungsmoduls (blau) und des Flachplatten-PBR (rot). Alle Spektren wurden normiert, indem jeder Wert durch den Maximalwert des jeweiligen Spektrums dividiert wurde.

² Teile dieser Ergebnisse sind bereits publiziert in: Benner, P., Lüdtker, F. J., Beyer, N., von den Eichen, N., Oropeza Vargas, J. E., & Weuster-Botz, D. (2023). LED illumination modules enable automated photoautotrophic cultivation of microalgae in parallel milliliter-scale stirred-tank bioreactors. *Applied Sciences* 13, 5064. <https://doi.org/10.3390/app13085064>

Das Spektrum des Sonnenlichts zeichnet sich durch eine messbare Lichtintensität über den gesamten Wellenlängenbereich aus. Die Spektren, welche die beiden PBR ausstrahlen, decken den PAR-Bereich von 400 – 700 nm ab. Allerdings verfügt das Spektrum des Beleuchtungsmoduls (blau) über ein etwas breiteres Spektrum, welches sich weiter in den niedrigen Wellenlängenbereich zieht. Dies zeigt sich für das menschliche Auge in einem kälteren weiß im Vergleich zum Flachplatten-PBR.

Die Zielvorgabe eines möglichst breiten, weißen Spektrums, welches das Sonnenlicht nachahmen soll, kann mit der gewählten LED umgesetzt werden. Im direkten Vergleich zeigt die gewählte LED ein homogeneres Spektrum als der Flachplatten-PBR, welcher als Referenz dient.

5.2. Positionierung der LEDs für idealen Lichteintrag

Um einen idealen Lichteintrag zu ermöglichen, wurden Beleuchtungsmodule für die LED-Beleuchtung am Boden jedes einzelnen Bioreaktors gestaltet. Jedes Beleuchtungsmodul lieferte dabei eine dynamische Lichtversorgung für zwei Reihen von Rührkessel-Bioreaktoren in der Bioreaktoreinheit (Abb. 23).

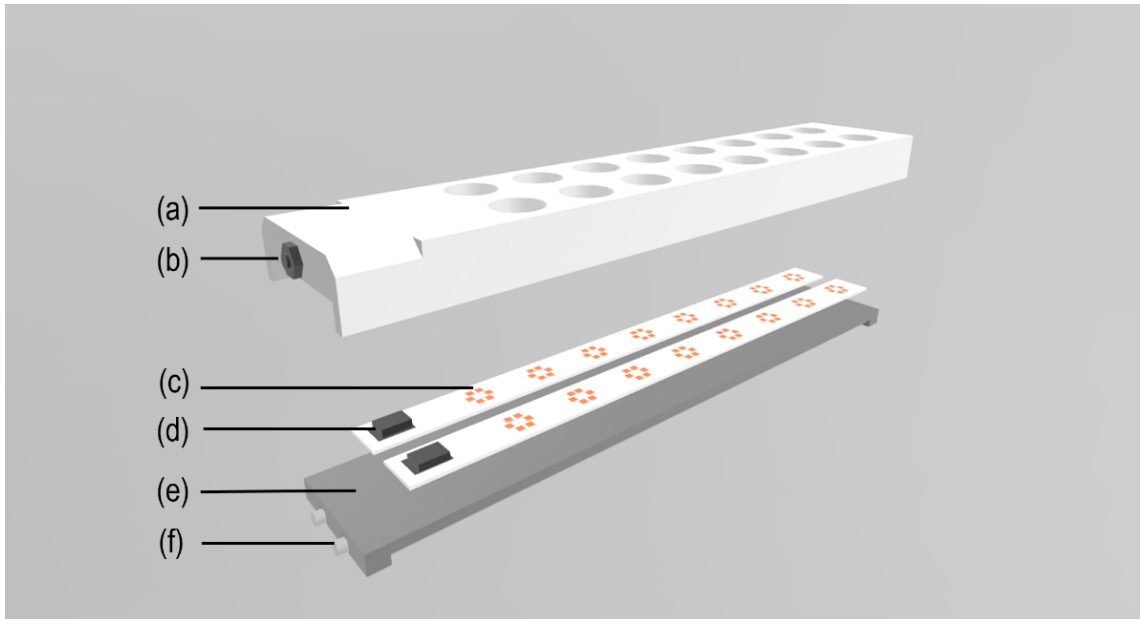


Abb. 23: Beleuchtungsmodul für zwei Reihen von Rührkessel-Bioreaktoren im mL-Maßstab: (a) Gehäuse, in dem alle Komponenten untergebracht sind: 6 LEDs, die genau unter jedem Bioreaktor positioniert sind, einzelne Beleuchtungspositionen sind dabei vom Außenlicht und Licht der benachbarten Positionen abgeschirmt; (b) Stromversorgungsbuchse SAL8 FK30; (c) zwei Platinen für LEDs (orange); (d) Steckverbindung, die mit b über Kabel verbunden ist; (e) Wärmetauscher aus Aluminium; (f) Zu- und Abflussrohr für Wasserkühlung. Diese Abbildung wurde mit der Software 3D Builder erstellt (Microsoft Corporation, Redmond, DC, USA; CADrays, OpenCascade, Issy-Les-Moulineaux, Frankreich).

Die LEDs wurden auf eine Leiterplatte gelötet, wobei jeweils sechs LEDs jede Reaktorposition beleuchten und eine Leiterplatte jeweils acht Reaktorpositionen bedient. Zwei Leiterplatten wurden auf einem Wärmetauscher aus Aluminium mit Wärmeleitpaste gesetzt. Die technische Zeichnung des Kühlkörpers ist im Anhang als Abb. A2 hinterlegt. Durch den Aluminiumkörper wurde ein wasserführendes Edelstahlrohr verlegt, das wiederum mit einem Durchflusskühlgerät (Kühleinheit 230 V/400 W, FRYKA-Kältetechnik GmbH, Esslingen am Neckar, Deutschland) verbunden war. Die Wassertemperatur für die LED-Kühlung war auf 16 °C eingestellt. Alle Komponenten wurden fest im Gehäuse der Beleuchtungsmodule montiert, um eine präzise Positionierung der LEDs unter den Bioreaktoren zu gewährleisten. Die technische Zeichnung des Gehäuses ist im Anhang als Abb. A3 hinterlegt. Der weiße Kunststoff des Gehäuses trennt jede einzelne Beleuchtungsposition sowohl vom Außenlicht, als auch vom Licht der benachbarten Positionen. Jedes Modul ist in der Lage, 16 parallele Rührkessel-Bioreaktoren zu beleuchten. Bei Verwendung von zwei oder drei Modulen werden die Kühlkreisläufe in Reihe geschaltet. Die Stromversorgungsbuchse (SAL8 FK30, CONEC Elektronische Bauelemente GmbH, Lippstadt, Deutschland) ist an der Vorderseite des Gehäuses angebracht und mit den

beiden Leiterplatten verbunden. Das Beleuchtungsmodul wird unter der parallelen mL-Rührkessel-Bioreaktoreinheit positioniert (Abb. 24), wo bei heterotrophen Kultivierungen sonst die Sensorriegel für pH- und DO-Messungen sitzen. Das weiße Gehäuse und die weiße Leiterplatte reflektieren das Licht effizient auf den Boden jedes einzelnen Bioreaktors. Die runden Öffnungen mit einem Durchmesser von 23 mm schließen dicht mit den Bioreaktorböden ab.

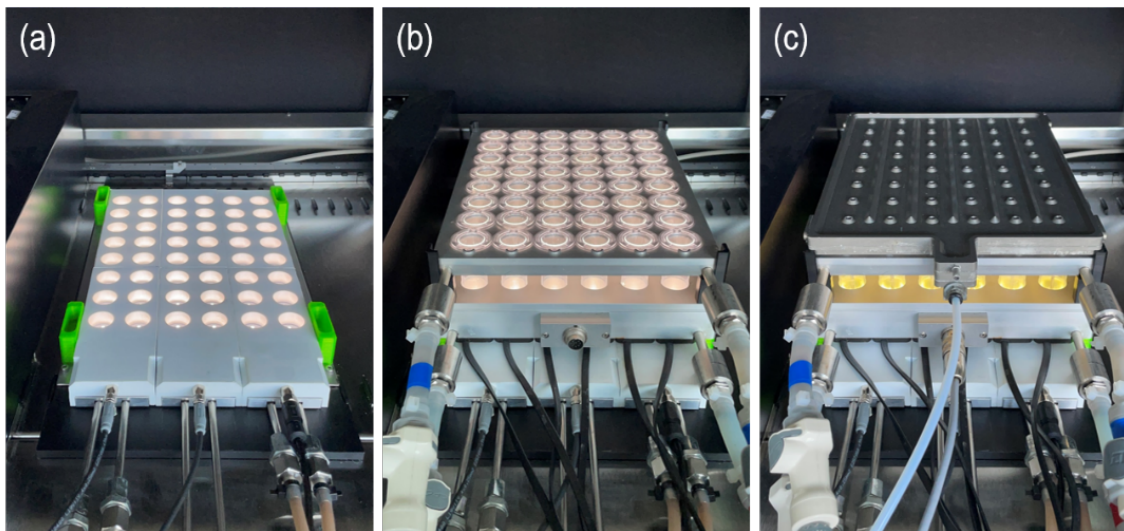


Abb. 24: (a) Das Foto zeigt drei Beleuchtungsmodul auf dem Deck des Pipettierroboters. Die LED-Beleuchtung ist eingeschaltet. (b) Die Bioreaktoreinheit (bioREACTOR48, 2mag AG, München, Deutschland) ist mit 48 Einweg-Bioreaktoren besetzt, die über den drei Beleuchtungsmodulen positioniert sind. Kopfraum-Kühlung und Kühlung für den magnetinduktiven Antrieb und parallele Rührkessel-Bioreaktoren sind angeschlossen. Die LED-Beleuchtung ist eingeschaltet. (c) Gasversorgungsdeckel ist auf der Bioreaktoreinheit angebracht. In den gerührten und beleuchteten Bioreaktoren befinden sich je 10 mL Mikroalgensuspension (*M. salina*).

Diskussion: Seitliche Beleuchtung

Während der Konzeption des Beleuchtungsmoduls wurden mehrere Prototypen gebaut. Eine wichtige Abwägung musste bei der Positionierung der LEDs getroffen werden. Es bestanden die Möglichkeiten der seitlichen Beleuchtung zwischen magnetisch induktivem Antrieb und Kopfraumkühlung oder der Beleuchtung des Reaktorbodens (Abb. 25). Eine 3D-Visualisierung der Bioreaktoreinheit mit seitlicher Beleuchtung ist zusätzlich im Anhang als Abb. A5 hinterlegt. Im Folgenden soll erläutert werden, wieso die Beleuchtung des Reaktorbodens umgesetzt wurde.

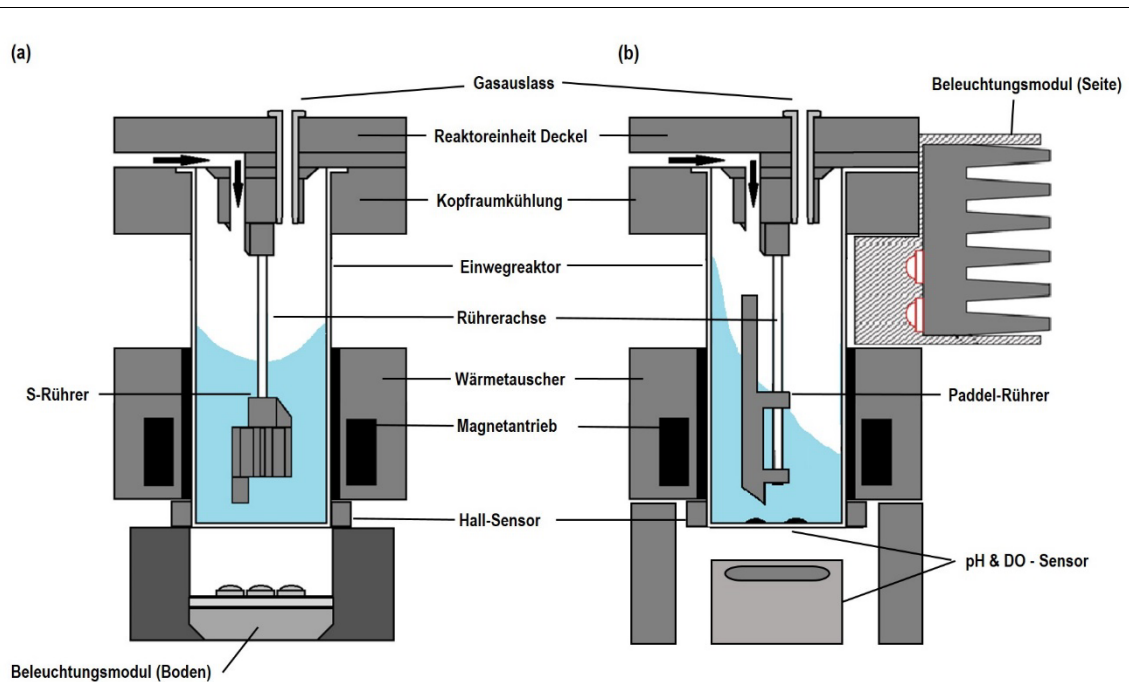


Abb. 25: Querschnittszeichnung eines miniaturisierten Rührkesselbioreaktors mit (a) Bodenbeleuchtung durch wassergekühltes Beleuchtungsmodul, sechs LEDs pro Reaktorposition, S-Rührer bildet schwache Trombe aus (b) Seitliche Beleuchtung durch Luftgekühltes Beleuchtungsmodul, zwei high power LEDs pro Reaktorposition, Paddel-Rührer bildet ausgeprägte Trombe.

Durch die seitliche Beleuchtung entstehen mehr Schattenbereiche, da das Licht im 90° Winkel reflektiert werden muss, um zum Reaktorboden zu gelangen. Viel Licht wird auf der Reaktorseite, die den LEDs gegenüberliegt, wieder austreten. Durch die Rundung des Bioreaktors wird vermutlich auch mehr Licht direkt zum Beleuchtungsmodul zurück reflektiert. Neben dem schlechteren Lichteintrag ist die Reflexion nachteilig für die Entwicklung von Modellen zur Lichtabsorption. Diese würden dadurch deutlich komplexer ausfallen und es müssten mehr Transmissionsmessungen durchgeführt werden. Die Definition der Schichtdicke, welche für die Modelle benötigt wird, würde durch die starke Trombenbildung deutlich mehr Annahmen und Vereinfachungen benötigen. Damit ein Teil der Algensuspension direkt beleuchtet wird, sollte die entstehende Trombe bis auf die Höhe der LEDs reichen. Damit liegt die mindestens benötigte Rührerdrehzahl bei 1500 U min^{-1} (bei 12 mL), was hohe Scherkräfte bedingt. Alternativ könnte das Volumen im Bioreaktor deutlich erhöht werden. Das Verhältnis von beleuchteter Oberfläche zum Volumen der Algensuspension würde dadurch allerdings verkleinert und der Lichteintrag somit verschlechtert. Schließlich wäre die seitliche Anbringung der LEDs und deren Kühlung schwer auf 48 Positionen zu erweitern, da zwischen den Reaktorreihen deutlich weniger Platz vorliegt als unterhalb.

Ein Vorteil der seitlichen Beleuchtung wäre, dass die Sensorriegel zur Messung von pH und OD am Boden der Bioreaktoren verbleiben könnten. Diese fallen bei der Beleuchtung des Reaktorbodens aus Platzgründen weg.

Ein weiterer Unterschied der beiden in Abb. 25 dargestellten Prototypen ist die Anzahl der LEDs. In der finalen Version mit Bodenbeleuchtung wurden sechs parallel geschaltete flache LEDs pro Bioreaktor verwendet. In der ersten Version mit Seitenbeleuchtung wurden zwei stärkere LEDs mit weitem Abstrahlwinkel verwendet. Die höhere Anzahl an LEDs sowie der flache Reaktorboden, im Gegensatz zur gerundeten Reaktorseite, führt zu einer gleichmäßigen Beleuchtung der lichtzugewandten Reaktoroberfläche und ist Voraussetzung für eine gesicherte Bestimmung der Eingangsphtonenflussdichte I_0 .

5.3. Steuerung und realisierbare Eingangsphtonenflussdichten

Die hier entwickelte Steuereinheit versorgt zwei Reihen an LEDs mit Strom und steuert diese. Die Beleuchtung der Bioreaktoren kann in Achtergruppen ein- und ausgeschaltet sowie gedimmt werden. Zwei eingebaute Konstantstromquellen (MeanWell LDD 300 H, Mean Well Enterprises, New Taipei City, Taiwan) liefern je 300 mA bei einer maximalen Spannung von 32 V. Die Konstantstromquellen wurden über eine mit dem Mikrocontroller (Raspberry Pi Pico, Raspberry Pi Foundation, Cambridge, UK) verbundene Schnittstelle für Pulsweitenmodulation (PWM) gedimmt. Eine elektronische Schaltzeichnung der Steuereinheit ist in Abbildung 26 dargestellt. Durch den Einsatz eines Abwärtswandlers (TSR 1-2433-, Traco Electronic, Baar, Schweiz), der den Mikrocontroller mit 3,3 V versorgt, war für jedes Beleuchtungsmodul nur ein einzelner Stromanschluss erforderlich. Zum Ein- und Ausschalten des Mikrocontrollers wurde ein haptischer Netzschalter verwendet. Der Mikrocontroller (Raspberry Pi Pico mit RP2040, Raspberry Pi Foundation, Cambridge, UK) übertrug PWM-Signale an die beiden 300-mA-Konstantstromquellen. Jede Stromquelle versorgte die LEDs für acht Reaktorpositionen. Die Steuereinheit wurde über fest verbaute Drucktasten bedient. Alternativ kann über einen USB-Anschluss die Steuereinheit ferngesteuert werden. Das OLED-Display wurde vom Mikrocontroller mit Strom versorgt und zeigte den gewählten Modus, die Zeit und die Lichtintensität in % oder $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ an.

Alle Komponenten der Steuereinheit wurden entsprechend des elektronischen Schaltbildes in einem 3D-gedruckten Gehäuse verbaut. Die Steuereinheit ist fotografisch in Abbildung 27 festgehalten.

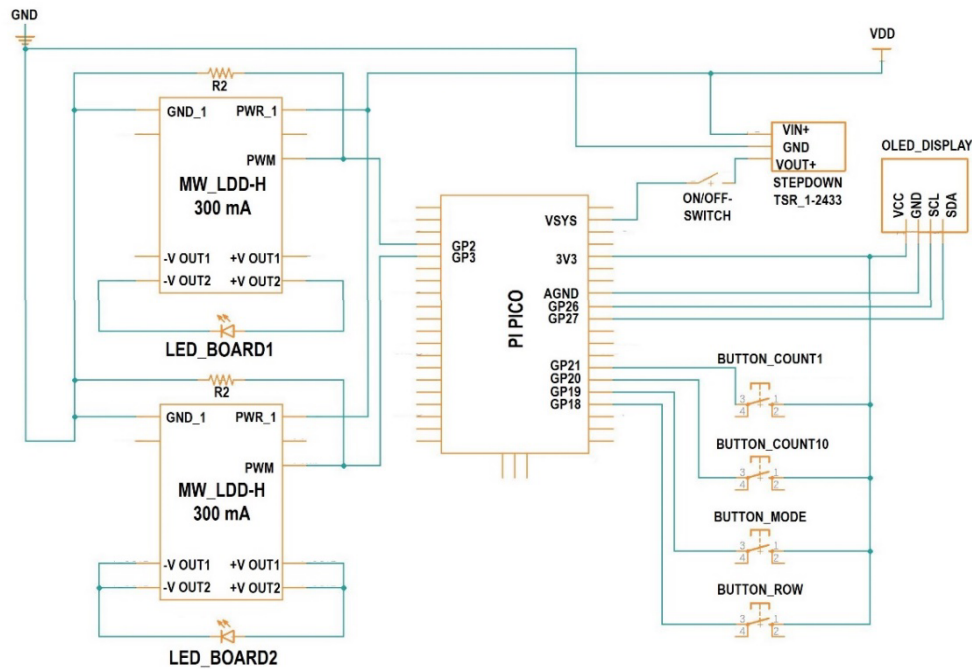


Abb. 26: Elektronisches Schaltbild der Steuereinheit. Das Beleuchtungsmodul ist durch ein LED-Symbol dargestellt. Die Konstantstromquelle MW_LDD-H mit einem Vorwärtsstrom von 300 mA versorgt das Beleuchtungsmodul. Die PWM-Eingangssignale werden über die 10-k Ω -Widerstände R1 und R2 geerdet. Stromversorgung für den PI_PICO (Raspberry Pi Pico) wird von einem TSR-1 Abwärtswandler (3,3 V) geliefert. Der „ON/OFF-Switch“ ist in Form eines Druckschalters umgesetzt, der dem Mikrocontroller die Stromzufuhr abtrennen kann. BUTTON_XYs sind Drucktasten, die als Eingangssignale für das Skript wirken. Ein OLED-Display ist direkt mit dem Mikrocontroller verbunden und wird von diesem mit Strom versorgt.

Die Software für die Steuereinheit (siehe Datenträger) wurde in MicroPython geschrieben und als Datei „main.py“ auf dem ROM des Mikrocontrollers gespeichert. Die Software steuert zwei LED-Reihen gleichzeitig und regelt deren Lichtintensität. Sobald der Mikrocontroller mit Strom versorgt wurde, startete das Skript und das Display und andere Bauteile initialisierten. Zunächst waren die LEDs ausgeschaltet und das Programm wartete auf Eingaben. Die Eingaben erfolgten über die Tasten erkannt und wurden direkt ausgeführt. Der konstante Beleuchtungsmodus schalteten sich die LEDs entsprechend des gewählten Wertes ein und ermöglicht ein lineares Dimmen der Bestrahlungsstärke. Die interne Echtzeituhr des Mikrocontrollers wurde verwendet, um die Zeit ab dem Beginn des Aufleuchtens anzuzeigen. Obwohl der Timer auf Millisekunden genau war, zeigte er während des Betriebs nur den Tag, die Stunde, die Minute und die Sekunde an.



Abb. 27: Steuereinheit mit Drucktasten, EIN/AUS-Schalter, OLED-Display, Stromversorgung und Stromausgang zum Beleuchtungsmodul. Die Tasten dienen zum Umschalten zwischen den Beleuchtungsmodi (Taste M: Start, konstanter Beleuchtungsmodus und Tag-Nacht-Beleuchtungsmodus) und den LED-Reihen (Taste #: Reihe 1 und Reihe 2). Die beiden anderen Tasten sind Zähler für schnelle und präzise Einstellung der Lichtintensität. Der erste Zähler erhöht die Intensität in 10%-Schritten (Taste T). Der zweite erhöht die Intensität in 1%-Schritten (Taste O).

Um die Ausführung des Tag-Nacht-Beleuchtungsmodus zu ermöglichen, wurde auf dem ROM eine CSV-Datei mit Wetterdaten aus Almeria, Spanien gespeichert. Die Tabellen-Datei enthielt zwei Spalten: das Datum und die Uhrzeit sowie die jeweilige Strahlung in Form der Lichtintensität $W\ m^{-2}$, wobei die Werte für jede Minute aufgezeichnet wurden. Aufgrund der begrenzten Größe des Arbeitsspeichers wurde nur jede 10. Zeile eingelesen, wobei die Lichtintensität ($W\ m^{-2}$) anschließend mit einem Umrechnungsfaktor von 0,4 (Faktor für PAR-Bereich) \times 4,64 (Faktor für Spektrum und Einheiten) in Photonenflussdichte ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) umgerechnet wurde. Der Zähler wurde in diesem Modus als prozentualer Verdünnungsfaktor interpretiert, um den die aus der CSV-Datei abgelesene Lichtintensität reduziert wurde. Die Lichtintensität wurde alle 10 Minuten aktualisiert. Datum, Uhrzeit und partielle Photonenflussdichte in $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ wurden im Tag-Nacht-Beleuchtungsmodus angezeigt.

Das Beleuchtungsmodul wurde vor allem in Hinblick auf realisierbare Eingangsphotonenflussdichten charakterisiert. Die emittierte Lichtintensität wurde im Abstand, den LEDs zum Reaktorboden (15 mm) haben, gemessen und ist in Abbildung 28 dargestellt.

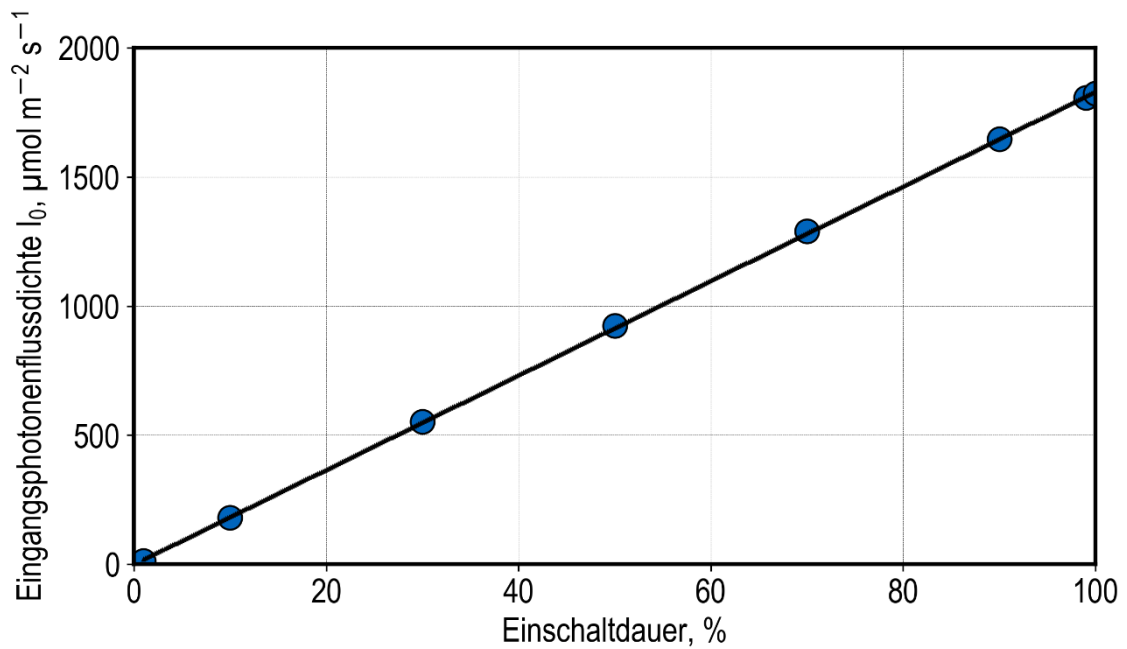


Abb. 28: An einer Reaktorposition eines Beleuchtungsmoduls gemessene Lichtintensitäten in Abhängigkeit von ausgewählten Einschaltdauer durch PWM-Dimmen zwischen 0 – 100 %. Die Lichtintensitäten wurden im Bereich 400 – 700 nm (PAR) gemessen.

Die Eingangsphtonenflussdichten zwischen 0 – 1817 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wiesen eine lineare Korrelation auf und konnten präzise eingestellt werden. Das Dimmen mittels PMW war zwischen 0 – 100 % mit einer theoretischen Genauigkeit von 65.535 Schritten wählbar. Für die parallele photoautotrophe Kultivierung von Mikroalgen in 48 Rührkessel-Bioreaktoren wurden drei Steuereinheiten und drei Beleuchtungsmodule benötigt.

Diskussion:

Die verwendete Methode zum Dimmen der Lichtintensität basiert auf dem schnellen Ein- und Ausschalten der LEDs. Es ist anzunehmen, dass diese Methode zum Dimmen das Wachstum von *M. salina* in den parallelen Rührkessel-PBRs nicht beeinflusst, da die PWM-Dimmfrequenz der LEDs auf 1000 Hz eingestellt wurde. In der Literatur wurde der Effekt des Blinklichts bei Frequenzen von 1 – 100 Hz untersucht (Abu-Ghosh et al., 2015; Degen et al., 2001). So zeigte sich bei einer Frequenz von 5 – 10 Hz ein erhöhter Ertrag an Biomasse von *Chlamydomonas reinhardtii* im Vergleich zu konstantem Lichteinfall, bei 100 Hz waren die Ergebnisse jedoch vergleichbar (Vejrazka et al., 2011).

Die einstellbaren Lichtintensitäten decken einen breiten Bereich ab. Größere Labor-PBR, wie der genannte Flachplatten-PBR, welcher als Referenz-Bioreaktor dient, können deutlich höhere Lichtintensitäten von bis zu 4000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einstellen, doch ist

dies für die angestrebten Untersuchungen vernachlässigbar. Da Mikroalgen absehbar nur mit Sonnenlicht kommerziell kultiviert werden können, ist es sinnvoll sich an natürlichen Lichtintensitäten zu orientieren. Die Wetterdaten aus Almeria, Spanien zeigen einen Maximalwert von etwa $1820 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf. Dieser Wert ist mit dem vorgestellten Beleuchtungsmodul zu erreichen. Andere Beleuchtungsmodule für die parallele photoautotrophe Kultivierung im mL bis μL Maßstab verfügen nur über geringere Lichtintensitäten: $72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tillich et al., 2014), getestet bis $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ojo et al., 2015), getestet bei $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Morschett et al., 2017). Die ausgewählten Mikroalgen *M. salina* und *S. ovalternus*, die exemplarisch für viele Mikroalgen stehen, zeigten in früheren Untersuchungen optimale mittlere integrale Photonenflussdichten von $543 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und $1041 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf (Koller et al., 2018; Pfaffinger et al., 2016b). Dieser Bereich kann ebenso mit dem vorgestellten Modul abgebildet werden.

6. Photoautotrophe Satzprozesse mit *M. salina* in miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren³

Das photoautotrophe und pH-kontrollierte Wachstum von *M. salina* wurde unter Verwendung des neu entwickelten Beleuchtungsmoduls in Verbindung mit der Bioreaktoreinheit bei unterschiedlichen konstanten Lichtintensitäten untersucht.

6.1. Parallele Reproduzierbarkeit

Es wurden drei Beleuchtungsmodule verwendet, um alle 48 Positionen parallel zu beleuchten. Um die Reproduzierbarkeit des Mikroalgenwachstums zu überprüfen, wurde jeweils eine Reihe von acht Rührkessel-Bioreaktoren mit der gleichen Eingangsfotonenflussdichte beleuchtet. In zwei automatisierten Experimenten (Abb. 29 und 30) wurden die Auswirkungen von insgesamt 12 verschiedenen konstanten Photonenflussdichten untersucht. Das Wachstum von *M. salina* wurde at-line durch Messung der OD₇₅₀ überwacht.

Das Wachstum von *M. salina* begann ohne Verzögerungsphase in allen 48 parallelen Rührkessel-PBR unmittelbar nach dem Start der Kultivierung durch das Einschalten der Beleuchtungsmodule. Die vorgegebene Abtastzeit von 12 Stunden für OD₇₅₀-Messungen erlaubt es nicht, kurze Verzögerungsphasen zu erkennen. Die Biomassebildung von *M. salina* in den ersten 12 h, die automatisch at-line als OD₇₅₀ gemessen wurde, war signifikant höher als in den nachfolgenden exponentiellen Wachstumsphasen, unabhängig von den variierenden einfallenden Lichtintensitäten zwischen 100 – 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach der Inokulation muss sich die Mikroalgenkultur an die neue Umgebung mit höherer Lichtintensität im Vergleich zum Vorkulturansatz anpassen, weswegen eine anfängliche Verzögerungs-Phase anzunehmen war. Die Gründe für den schnellen Anstieg der OD₇₅₀ innerhalb der ersten 12 Stunden sind unbekannt. Die OD-Messungen könnten durch Veränderungen der optischen Eigenschaften der Mikroalgen bei der angewandten Wellenlänge beeinflusst werden (z. B. durch morphologische Anpassung der Zellen).

³ Teile dieser Ergebnisse sind bereits publiziert in: Benner, P., Lüdtke, F. J., Beyer, N., von den Eichen, N., Oropeza Vargas, J. E., & Weuster-Botz, D. (2023). LED Illumination Modules Enable Automated Photoautotrophic Cultivation of Microalgae in Parallel Milliliter-Scale Stirred-Tank Bio-reactors. *Applied Sciences*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/app13085064>

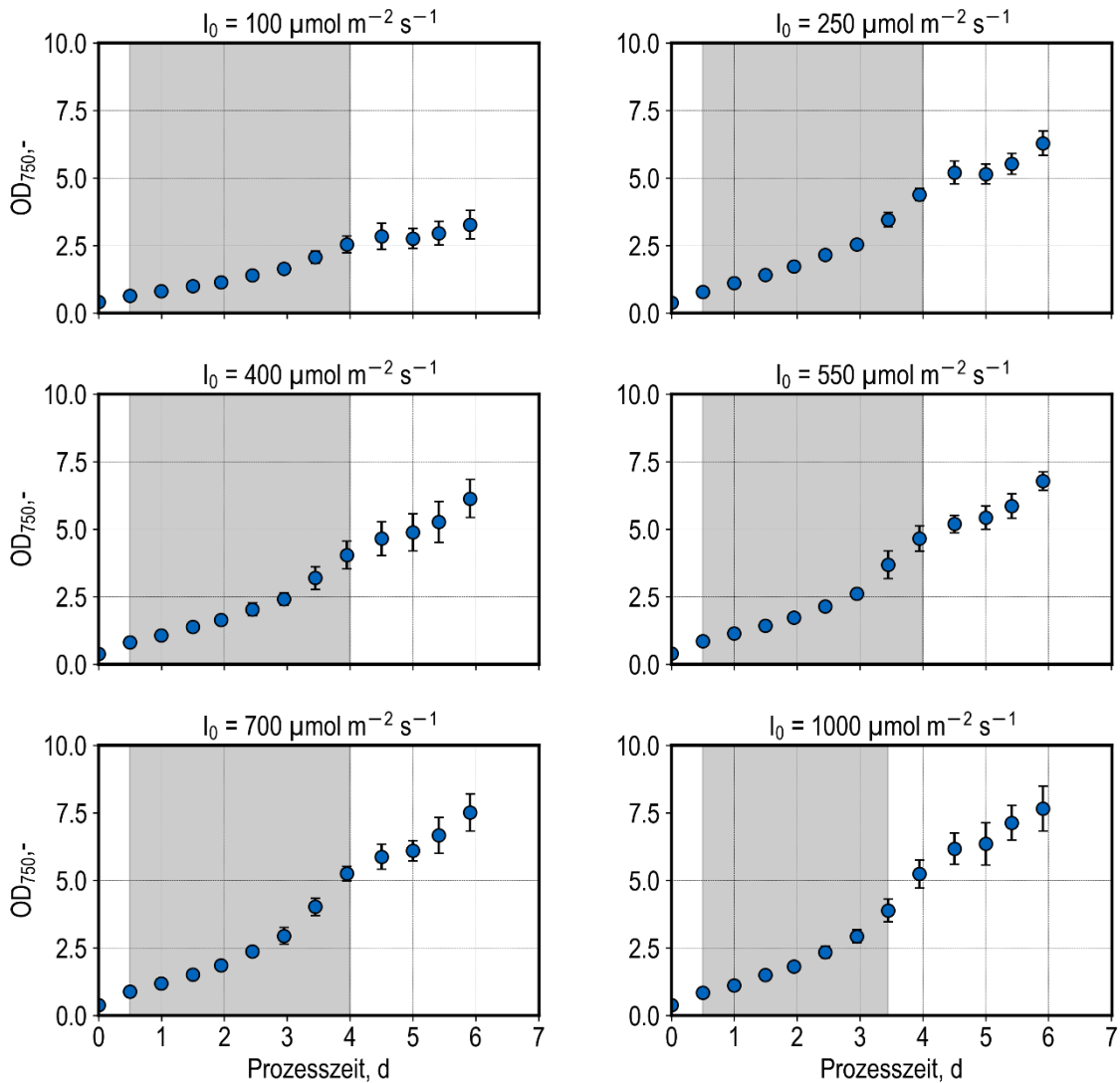


Abb. 29: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierung von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Die sechs Reihen mit je acht Bioreaktoren in der Bioreaktoreinheit wurde mit verschiedenen Eingangspotenzen beleuchtet. Jeder Bioreaktor wurde zunächst mit 10 mL *M. salina*-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen OD_{750} von 0,5 (anfänglicher pH $8 \pm 0,3$) gefüllt. Es wurden magnetisch angetriebene S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO_2 begast. Die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an, die zur Schätzung der einzelnen exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit von den einfallenden Lichtintensitäten verwendet wurde.

Individuelles konstantes exponentielles Wachstum von *M. salina* wurde in den folgenden 3 – 3,5 d beobachtet, wonach anschließend ein linearer Anstieg der OD_{750} gemessen wurde. Die relativen Standardabweichungen der OD_{750} waren in den ersten 3 Tagen der Satz-Prozesse geringer (durchschnittlich $<8,5 \%$), stiegen aber bis zum 6. Tag auf durchschnittlich 10 % an. Diese Abweichungen liegen in der gleichen Größenordnung, wie sie

zuvor bei heterotrophen Parallelkulturen von Mikroorganismen in miniaturisierten Rührkessel-Bioreaktoren berichtet wurden (Hortsch & Weuster-Botz, 2011; Schmieder et al., 2016; Strillinger et al., 2016; Von den Eichen et al., 2021).

Es wurde eine zweite photoautotrophe Wachstumsstudie mit 48 parallelen Rührkessel-PBR mit *M. salina* durchgeführt, bei der die einfallenden Lichtintensitäten reihenweise im Bereich von 40 – 1817 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ variiert wurden. So sollten die Auswirkungen, sowohl niedriger als auch höherer konstanter einfallender Lichtintensitäten, im Vergleich zur vorherigen Studie untersucht werden.

Wie zuvor, konnte bei niedrigen Lichtintensitäten keine Verzögerungsphase beobachtet werden. Nach der anfänglichen schnellen Zunahme der OD_{750} , konnte exponentielles Wachstum von *M. salina* bis zu 3,5 Tage lang beobachtet, bevor ein linearer Anstieg der OD_{750} gemessen wurde. Im Gegensatz dazu wurden bei hohen konstant einfallenden Lichtintensitäten von 1400 – 1817 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Verzögerungs-Phasen von 1,5 d nach der anfänglichen Zunahme der OD_{750} beobachtet. Die folgenden exponentiellen Wachstumsphasen von *M. salina* betragen 2 d, bevor der lineare Anstieg der OD_{750} stattfand. Die relativen Standardabweichungen der OD_{750} -Messungen waren am Ende der Satzprozesse mit der höchsten einfallenden Lichtintensität ebenfalls höher (bis zu 15 % bei 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bzw. bis zu 28 % bei 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

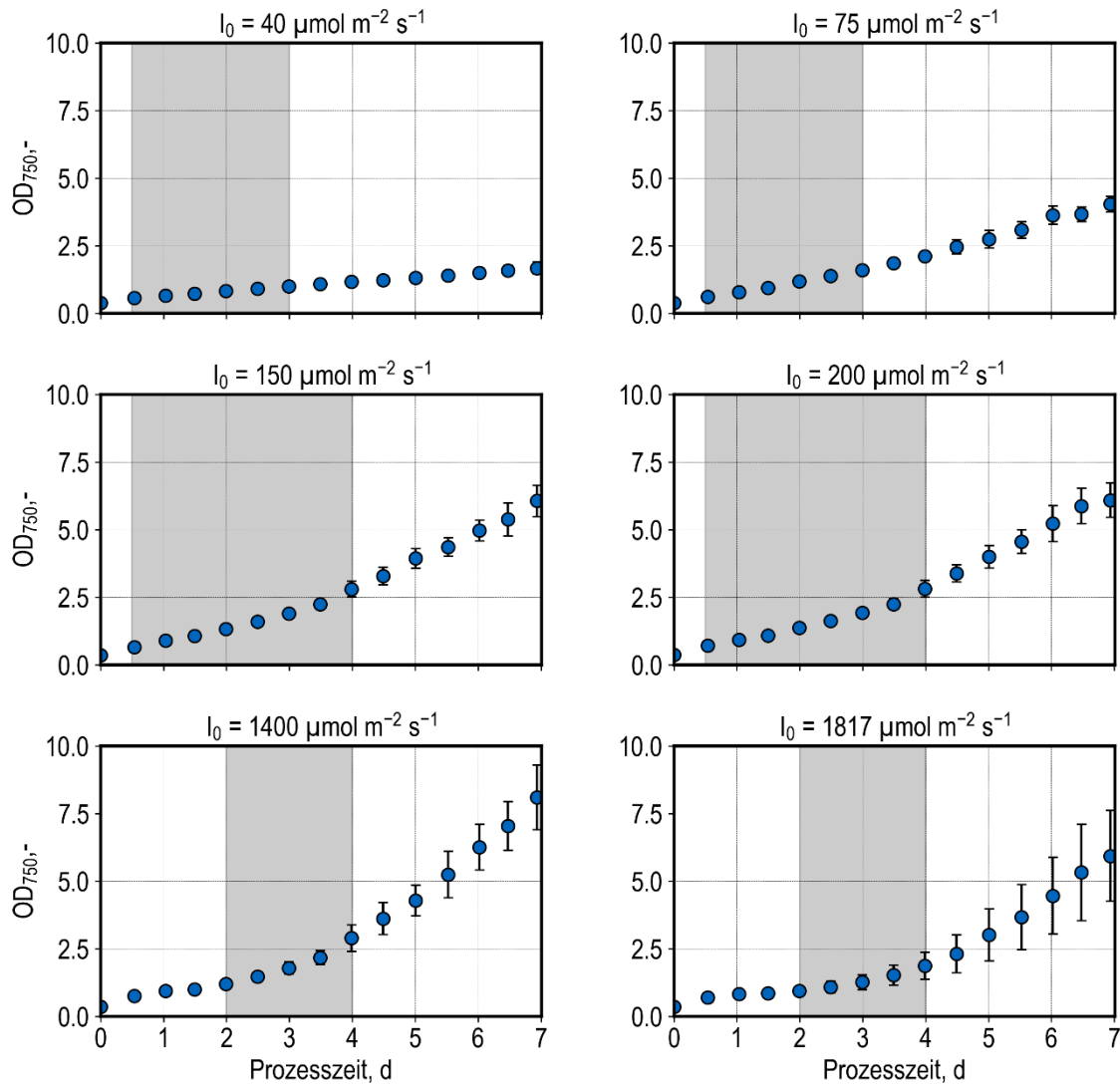


Abb. 30: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierungen mit *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Jede der sechs Reihen mit je acht PBR in der Bioreaktoreinheit wurde mit verschiedenen Eingangspotenzen I_0 beleuchtet. Jeder Bioreaktor wurde zunächst mit 10 mL *M. salina*-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen OD₇₅₀ von 0,5 und einem anfänglicher pH von $8 \pm 0,3$ gefüllt. Es wurden magnetisch angetriebene S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-PBR wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO₂ begast. Die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an, die zur Schätzung der einzelnen exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit von den einfallenden Lichtintensitäten verwendet wurde.

In Abbildung 31 sind die exponentiellen Wachstumsraten und die OD₇₅₀ an Tag 6 der einzelnen Satz-Prozesse als Funktion der konstanten Eingangspotenz aufgetragen.

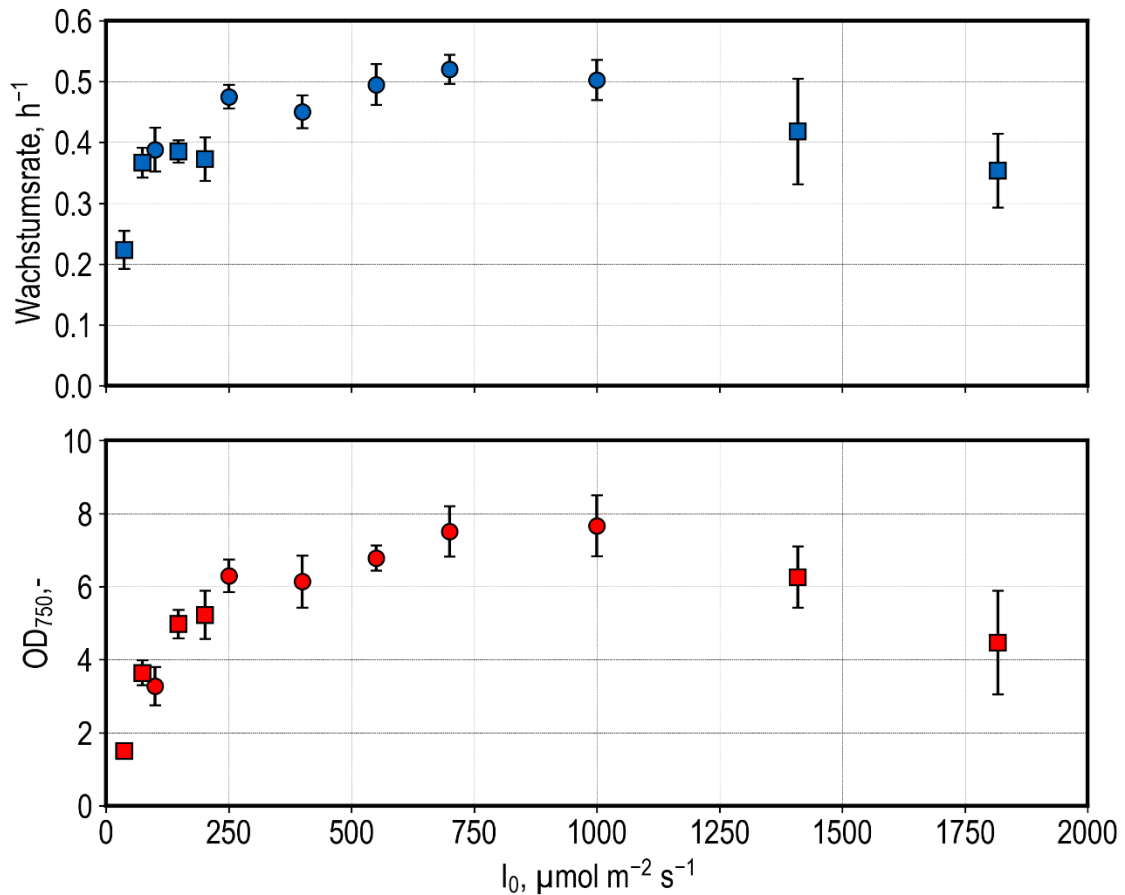


Abb. 31: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierungen von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR (● erstes Experiment, ■ zweites Experiment). Geschätzte exponentielle Wachstumsraten von *M. salina* (blau) und OD_{750} nach 6 d (rot) als Funktion der konstanten einfallenden Lichtintensitäten I_0 . Die Standardabweichungen basieren auf $n = 8$ parallelen Rührkessel-Bioreaktoren.

Die exponentiellen Wachstumsraten von *M. salina* und die OD_{750} nach 6 d steigen nicht-linear mit zunehmender Lichtintensität bis zu $\sim 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Beide Zustandsgrößen waren anschließend innerhalb der Standardabweichung konstant ($\mu_{\text{max}} \sim 0,5 \text{ d}^{-1}$), was auf eine Lichtlimitierung der Mikroalgen in der Suspension hindeutet. Eine signifikante Reduktion der exponentiellen Wachstumsrate von *M. salina* ist bei der höchsten einfallenden Lichtintensität von $1830 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deutlich zu erkennen, was auf eine Inhibition der Mikroalgen zurückzuführen ist. Obwohl die Daten der exponentiellen Wachstumsraten und die OD_{750} jeweils aus zwei sequentiell durchgeführten Experimenten stammen, passen die Werte innerhalb der Standardabweichungen zum Trend der Kurven, was auf eine sequenzielle Reproduzierbarkeit hinweist.

Die maximalen Wachstumsraten von *M. salina*, die in den parallelen Rührkessel-PBR mit konstanter Beleuchtung ($\mu_{\text{max}} = 0,525 \text{ d}^{-1}$) beobachtet wurden, wurden mit den Literaturdaten verglichen (Tab. 2). Allerdings weisen die verwendeten *M. salina*-Stämme, die Medien, die Dicke der beleuchteten Schicht und die Bioreaktortypen Unterschiede

auf, welche einen direkten Vergleich erschweren. Optimale Wachstumsraten von *M. salina* werden zwischen 0,1 und 1,3 d⁻¹ angegeben (Huesemann et al., 2013; Ocaranza et al., 2022; Pfaffinger et al., 2019; Sukenik, 1991; Van Wageningen et al., 2012). Die in den Rührkessel-PBR gemessene maximale OD₇₅₀ ist vergleichbar mit den von Pfaffinger et al. (Pfaffinger et al., 2016b) veröffentlichten Daten, die über photoautotrophe Kulturen von *M. salina* unter Verwendung eines Flachplatten-Gaslift-PBR im L-Maßstab mit einer Schichtdicke von 2 cm berichten. Mit einer deutlich geringerer Schichtdicke von 6 mm (Pfaffinger et al., 2019) oder deutlich längeren Prozesszeiten von 50 d (Van Wageningen et al., 2012) werden höhere BTM-Konzentrationen erreicht. Weitere aktuelle Literatur (Ocaranza et al., 2022) zeigten Daten mit *M. salina* bei deutlich geringeren Photonenflussdichten und dadurch auch geringeren Wachstumsraten und BTM-Konzentrationen.

Tab. 2: Die höchsten Wachstumsraten (μ_{\max}) und maximale BTM-Konzentrationen (BTM_{max}) die für *M. salina* in photoautotrophen Satz-Kultivierungen bei konstanter Beleuchtung berichtet wurden.

| Quelle | BTM _{max} (g L ⁻¹) | μ_{\max} (d ⁻¹) | Stamm | Medium | Eingangsphtonenflussdichte ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | Schichtdicke (mm) |
|-----------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------|-------------|--|----------------------|
| Ocaranza et al., 2022 | 0,62 (nach 8 d) | 0,108 | <i>M. salina</i> (CSIRO) | ASW, f/2 | 50 | unknown |
| Pfaffinger et al., 2019 | 10 (nach 7 d) | 0,792 | <i>M. salina</i> (SAG) | ASW | * | 6 |
| Pfaffinger et al., 2016b | 4,5 (nach 9 d) | 0,744 | <i>M. salina</i> (SAG) | ASW | * | 20 |
| Eigene Daten | 3,4 ** (nach 6 d) | 0,525 | <i>M. salina</i> (SAG) | ASW | 1000 | 35 |
| Van Wageningen et al., 2012 | 14,2 (nach 50 d) | 1,3 | <i>M. salina</i> (CCMP) | f/2-Si | 250 | 46 |
| Sukenik, 1991 | unbekannt | 0,72 | *** | f/2 | 290 | 50 |

* Die einfallende Lichtintensität wurde nicht veröffentlicht. ** Die BTM-Konzentration wurde auf der Grundlage der gemessenen OD₇₅₀ unter Anwendung eines linearen Korrelationsfaktors von 0,44 g L⁻¹ berechnet. *** *Nannochloropsis* sp. Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG), National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA ehemals CCMP).

6.2. pH

Ein unregelmäßiger pH könnte in den parallelen Rührkessel-PBR einen Einfluss sowohl auf die Wachstumsraten als auch auf die maximalen BTM-Konzentrationen haben. In Abbildung 32 ist der gemessene pH als Funktion der Prozesszeit dargestellt. Der pH wurde mit einer Abtastzeit von 12 h automatisiert at-line gemessen und bei Bedarf angepasst.

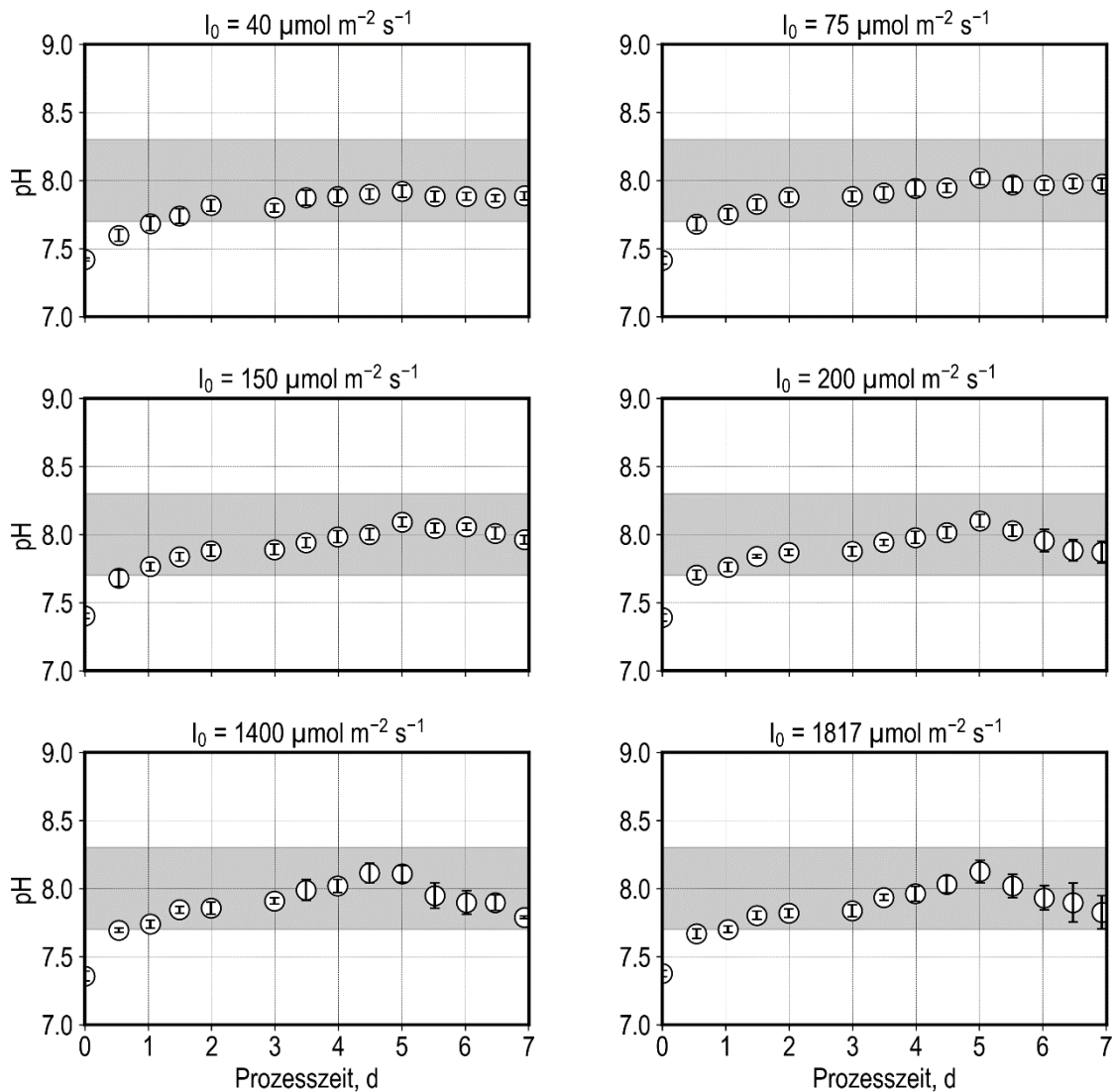


Abb. 32: Mittlerer pH und Standardabweichungen ($n=8$) während automatisierter photoautotropher Satz-Kultivierung von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Jede Reihe von acht Bioreaktoren in der Bioreaktoreinheit wurde mit sechs verschiedenen Lichtintensitäten I_0 beleuchtet. Jeder Bioreaktor wurde zunächst mit 10 mL *M. salina*-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen OD_{750} von 0,5 (anfänglicher pH 8) gefüllt. Es wurden magnetisch angetriebene S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO_2 gespült. Wenn der at-line gemessene pH unter 7,7 oder über 8,3 lag (grau schraffierter Bereich), wurden entweder $45 \mu\text{l}$ Base (0,5 M NaOH) oder Säure (0,5 M HCl) in den betreffenden Bioreaktor durch den Pipettierroboter zugegeben.

Obwohl der anfängliche pH des ASW-Mediums vor der Beimpfung bei pH 8,0 lag, sank der pH zu Beginn des Satz-Prozesses aufgrund der 2 % CO₂ Begasung auf pH 7,3. Nach dreimaliger Zugabe von Base durch den Pipettierroboter (0 d, 0,5 d und 1,0 d) wurde die untere Grenze des unkontrollierten pH-Bereichs (pH 7,7) in allen 48 parallelen PBRs erreicht. Anschließend stieg der pH aufgrund der gestiegenen CO₂-Fixierung durch die Mikroalgen in Suspension an, und es war keine weitere Zugabe von Basen oder Säuren erforderlich. Nach 5 d begann der pH in den Rührkessel-PBR ab konstanten Lichtintensitäten von 150 μmol m⁻² s⁻¹ zu sinken, aber eine pH-Titration war nicht erforderlich (> pH 7,7). Der sinkende pH korreliert mit der sinkenden Wachstumsrate (siehe Abb. 30), da gegen Ende des Prozesses weniger CO₂ verbraucht wird.

Diskussion:

Die pH-Kontrolle passt den anfänglichen pH eher langsam an, aber die meisten Mikroalgen tolerieren einen neutralen oder leicht alkalischen pH (Goldman et al., 1982) und haben ein breites pH-Optimum für das Wachstum (Apel et al., 2017; Boussiba et al., 1987). Für eine schnellere Anpassung des pH könnte die Abtastzeit auf 8 h reduziert werden einhergehend mit einer häufigeren Probenahme. Weiterhin könnte die Base mit höherer Konzentration verwendet werden, wodurch allerdings die Gefahr zu Übersteuern besteht. Da die gewählten Einstellungen gut für die dargestellten Kultivierungen funktionieren, besteht kein Bedarf zur Anpassung der Methoden.

6.3. Verdunstung

Aufgrund der Prozessdauer von mehreren Tagen bei Mikroalgenkultivierungen, führen unterschiedliche Verdunstungsraten in den parallelen PBR möglicherweise zu kritischen Unterschieden im Volumen in den parallelen Bioreaktoren und verschlechtern so die Reproduzierbarkeit. Wie beschrieben, wird die Verdunstung durch individuell gemessene Flüssigkeitsstände in den parallelen Rührkessel-PBR kompensiert, gefolgt von einer Flüssigkeitsstands-Korrektur durch die individuelle Zugabe von vollentsalzten Wasser (VE-Wasser). Das zugegebene Gesamtvolumen wurde für jeden der parallelen PBR verfolgt und es konnten mittlere Verdunstungsraten geschätzt werden. Die einzelnen Verdunstungsraten sind in Abbildung 33 aufgetragen. Die Daten stammen aus der ersten Kultivierung (siehe Abb. 29).

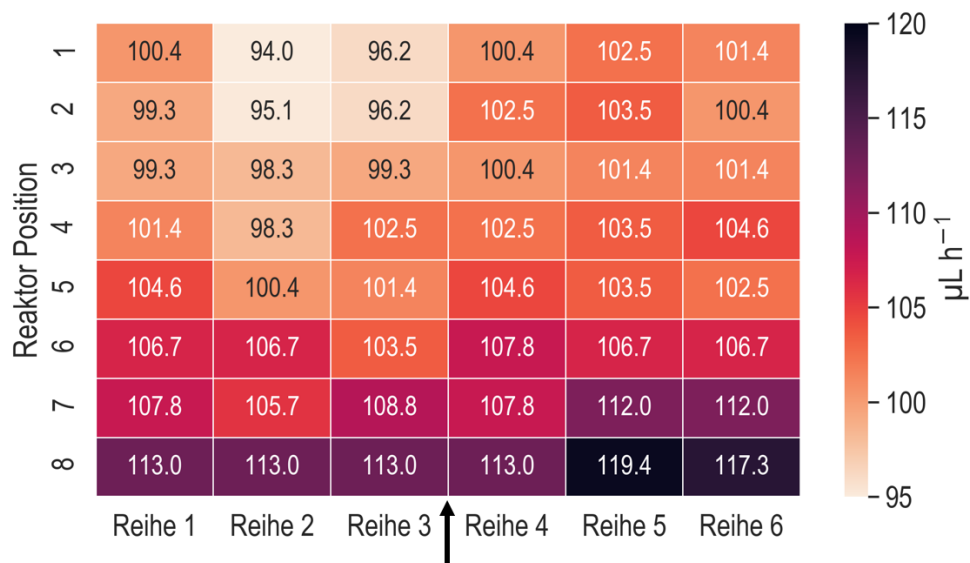


Abb. 33: Verdunstungsraten während einer photoautotrophen Satz-Kultivierung von *M. salina* in Rührkessel-PBR. Das Layout zeigt die Positionierung der 48 parallelen PBRs innerhalb des Bioreaktors. Die endgültigen Verdunstungsraten wurden durch Aufsummieren der Mengen an VE-Wasser, das zur automatischen Korrektur des Flüssigkeitsstands zugegeben wurde, geschätzt. Der Einlass der Gasversorgungsabdeckung der Bioreaktoreinheit befindet sich zwischen der dritten und vierten Reihe der Reaktorposition 8 und ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Als Dezimaltrennzeichen dient ein Punkt.

Die Verdunstungsraten schwankten im Bereich von $94,0 - 119,4 \mu\text{L h}^{-1}$, mit einem Mittelwert von $104 \pm 5,7 \mu\text{L h}^{-1}$. Es wird deutlich, dass automatisierte individuelle Flüssigkeitsstands-Korrekturen erforderlich sind, wenn trockene Luft zur Begasung der parallelen Rührkessel-PBR verwendet wird.

Diskussion:

Der Abgleich mit der parallelen Reproduzierbarkeit in Abb. 29 und Abb. 30 zeigt, dass ein erfolgreich durchgeführter Verdunstungsausgleich die Unterschiede in den Verdunstungsraten ohne weitere Folgen kompensieren kann.

Bei typischen heterotrophen Satz-Kultivierungen mit einer Dauer von einigen Stunden bis zu einem Tag ist davon auszugehen, dass die mittlere Abweichung der Verdunstungsraten zwischen den Bioreaktorpositionen von 5,5 % keinen entscheidenden Effekt haben. Photoautotrophe Prozesse mit Mikroalgen dauern jedoch deutlich länger als heterotrophe Prozesse. Im verwendeten miniaturisierten Mikrobioreaktor liegen leicht unterschiedliche Gasvolumenströme in den verschiedenen Reaktorpositionen vor. Dies führt zu unterschiedlichen Verdunstungsraten in den Positionen, die sich über die Dauer

des Prozesses zu deutlichen Unterschieden im Volumen der Bioreaktoren summieren können. Insbesondere wenn mehrere Reihen an Bioreaktoren betrieben werden, können die Füllstände vom Experimentierenden nicht mehr eingesehen werden, was folglich einen automatisierten Ansatz verlangt.

Durch die simple Bauweise des Deckels des Reaktorsystems, welche auf Schalter, Ventile oder ähnliches verzichtet, können kleine Unterschiede im Gasvolumenstrom, der die einzelnen Bioreaktoren erreicht, nicht vermieden werden. Dies führt zu Unterschieden in der Verdunstungsrate der Bioreaktoren und so, über mehrere Prozesstage hinweg, zu unterschiedlichen Füllständen in den Bioreaktoren. Das würde wiederum zu Unterschieden in der Konzentration von Medienbestandteilen und Schichtdicken führen. Variierende Schichtdicken beeinflussen die Lichtverfügbarkeit im PBR. Die stündliche Prüfung und der automatisierte Ausgleich der Füllstände ist daher essenziell für photoautotrophe Kultivierungen.

Eine individuelle Messung der Flüssigkeitsstände in parallelen PBR mit anschließender Flüssigkeitsstands-Korrektur wird daher die parallele Reproduzierbarkeit von photoautotrophen Bioprozessen verbessern. Die Verdunstungskompensation ist ein wichtiger Aspekt bei der Kultivierung von Mikroalgen, unabhängig von den verwendeten Photobioreaktoren (Talent et al., 2014).

6.4. Kultivierung mit Klimasimulation

Die Kultivierung von Mikroalgen im Freien unterliegt Temperatur- und Lichtintensitätsschwankungen, die sich aus den natürlichen Tages- und Nachtzyklen ergeben. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Tag- und Nachtzyklen von einfallenden Lichtintensitäten und Temperaturen verwendet, die so konfiguriert sind, dass sie typische mediterrane Klimabedingungen imitieren (wiederholter Sommertag in Almeria, Spanien, aufgenommen vom DLR auf der Plataforma Solar de Almería am 15. Juni 2012, mit freundlicher Genehmigung von S. Wilbert), um das Wachstum von *M. salina* in 16 parallelen Rührkessel-PBR zu untersuchen (Abb. 34). Eine Reihe von acht parallelen PBR wurde mit 66 % der einfallenden Lichtintensitäten beleuchtet, während die Beleuchtung der zweiten Reihe den realen Klimadaten folgte. Die Reduzierung der Lichtintensität auf 66 % soll einen Hinweis auf das Wachstum bei geringerer Sonneneinstrahlung, wie bei bewölktem Himmel, geben.

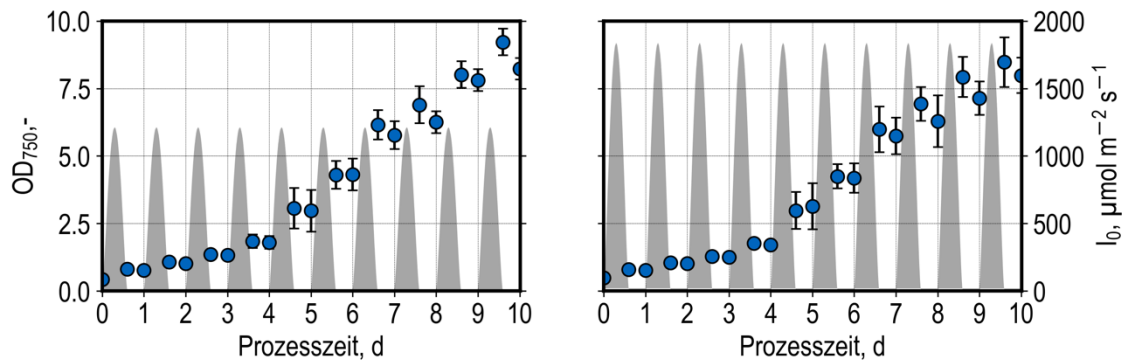


Abb. 34: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierung von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR mit simulierten Tag- und Nachtzyklen, die typische mediterrane Klimabedingungen imitieren (wiederholter Sommertag in Almeria, Spanien, aufgenommen vom DLR auf der Plataforma Solar de Almería am 15. Juni 2012, mit freundlicher Genehmigung von S. Wilbert). Eine Reihe von acht gerührten PBR in der Bioreaktoreinheit wurde mit 66% beleuchtet (links), die zweite Reihe mit 100% Lichtintensität (rechts). Die graue Schattierung zeigt die dynamischen Variationen der einfallenden Lichtintensität an. Die Temperatur aller parallelen PBR wurde stündlich an die Klimadaten angepasst. Jeder Bioreaktor wurde zunächst mit 10 mL *M. salina*-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen OD_{750} von 0,5 (anfänglicher pH 8) gefüllt. Es wurden magnetisch angetriebene S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO_2 begast. Die Probenahme erfolgte zu physikalisch simulierten Sonnenaufgangs- und Sonnenuntergangszeiten.

Die Mikroalgen zeigten ein Verhalten, das typisch für die simulierten Phasen ist: Biomassebildung, solange Licht vorhanden war, und Biomasseabbau, wenn kein Licht vorhanden war. In Anlehnung an die realen mediterranen Klimadaten wurden im Vergleich zu den reduzierten Lichteinfallintensitäten (66 %) keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Nach 9,5 d wurden eine mittlere OD_{750} von $8,96 \pm 0,84$ (100 % Beleuchtung) und $9,89 \pm 0,68$ (66 % Beleuchtung) gemessen. Der pH schwankte zwischen pH 7,5 und pH 8,0 (Daten nicht gezeigt). Die maximalen volumetrischen Produktivitäten wurden am 6. Tag erreicht: $0,81 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (100 %) und $0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (66 %). Dies entspricht den Ergebnissen, die mit *M. salina* in photoautotrophen Satz-Prozessen bei konstanten einfallenden Lichtintensitäten von $250 - 1000 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erzielt wurden.

Die maximalen volumetrischen Produktivitäten von *M. salina*, die in den parallelen Rührkessel-PBR mit Tag- und Nachtzyklen beobachtet wurden, werden mit Daten aus der Literatur verglichen (Tab. 3). Nur Pfaffinger et al. (2019) berichteten über höhere volumetrische Produktivitäten ($4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) mit dem gleichen Mikroalgenstamm, derselben Klimasimulation und ebenfalls ASW-Medium. Dies ist auf die geringere Schichtdicke von 6 mm im Vergleich zu 35 mm in den parallelen Rührkessel-PBR zurückzuführen, die ein exponentielles Wachstum bei höheren BTM-Konzentrationen ermöglichen.

Tab. 3: Maximale volumetrische Produktivität und maximale BTM-Konzentration, die für *M. salina* in photoautotrophen Satz-Kultivierungen mit Tag- und Nachtzyklen berichtet wurden.

| Quelle | BTM_{max} ($g L^{-1}$) | Produktivität _{max} ($g L^{-1} d^{-1}$) | Stamm | Medium | Beleuchtung | Schichtdicke (mm) |
|-------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|--------|---|----------------------|
| Pfaffinger et al., 2019 | 33 (nach 14 d) | ~4 | <i>M. salina</i> (SAG) | ASW | Sommer Tag, Almeria, Spanien ** | 6 |
| Hulatt et al., 2017 | 4,7 (nach 16 d) | 0,51 | <i>N. sp. 211/78</i> (CCAP) | f/2 | 180 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ 16 h–8 h Tageszeiten Simulation | 14 |
| Thurn et al., 2022 | 5,5 (nach 12 d) | 0,7 | <i>M. salina</i> (SAG) | f/2 | Sommer Tag, Newcastle, Australien *** | 20 |
| Eigene Daten | 4,0 * (nach 10 d) | 0,81 | <i>M. salina</i> (SAG) | ASW | Sommer Tag, Almeria, Spanien ** | 35 |

* Die BTM-Konzentration wurde auf der Grundlage der gemessenen OD_{750} mit einem linearen Korrelationsfaktor von $0,44 g L^{-1}$ berechnet. ** Aufgenommen vom DLR an der Plataforma Solar de Almeria am 15. Juni 2012 (mit freundlicher Genehmigung von S. Wilber). *** Aufgenommen von der BSRN-Station Nr. 52 am 19. Januar 2018 (Duck, 2018).

7. Skalierbarkeit photoautotropher Satzprozesse mit *M. salina*

Für den Transfer von photoautotrophen Bioprocessen und Beurteilung der Skalierbarkeit ist die Wachstumskinetik der Mikroalgen in Abhängigkeit von der mittleren Lichtverfügbarkeit in der Suspension notwendig. Dafür wird vorausgesetzt, dass Licht die einzige limitierende Zustandsgröße ist. Die mittlere integrale Photonenflussdichte ist eine Funktion der einfallenden Lichtintensität, der Mikroalgenzellkonzentration, der Wachstumsrate, der Lichtabsorption und der Reflexionsphysik in der Zellsuspension und des PBR.

Im Folgenden sollen Studien zur Übertragbarkeit photoautotropher Bioprocesse zwischen Flachplatten- und miniaturisierten Rührkessel-PBR beschreiben werden.

7.1. Photoautotrophe Satzprozesse mit *M. salina* in Flachplatten-PBR

Um einen Transfer von Wachstumsverhalten von Mikroalgen beurteilen zu können, sollen zunächst Satzkultivierungen von *M. salina* in einem Flachplatten-PBR durchgeführt werden, welcher als Referenz dient. Dabei wurden Aspekte der Prozesssteuerung, wie die pH-Kontrolle mittels Titration und konstanter CO₂-Gehalt der Begasung, den Bedingungen in den mL-Bioreaktoreinheit angeglichen. Neben der Bestimmung der Optischen Dichte während des Prozesses, wurden außerdem Transmissionsmessungen durchgeführt und diese zusammen in Abb. 35 dargestellt.

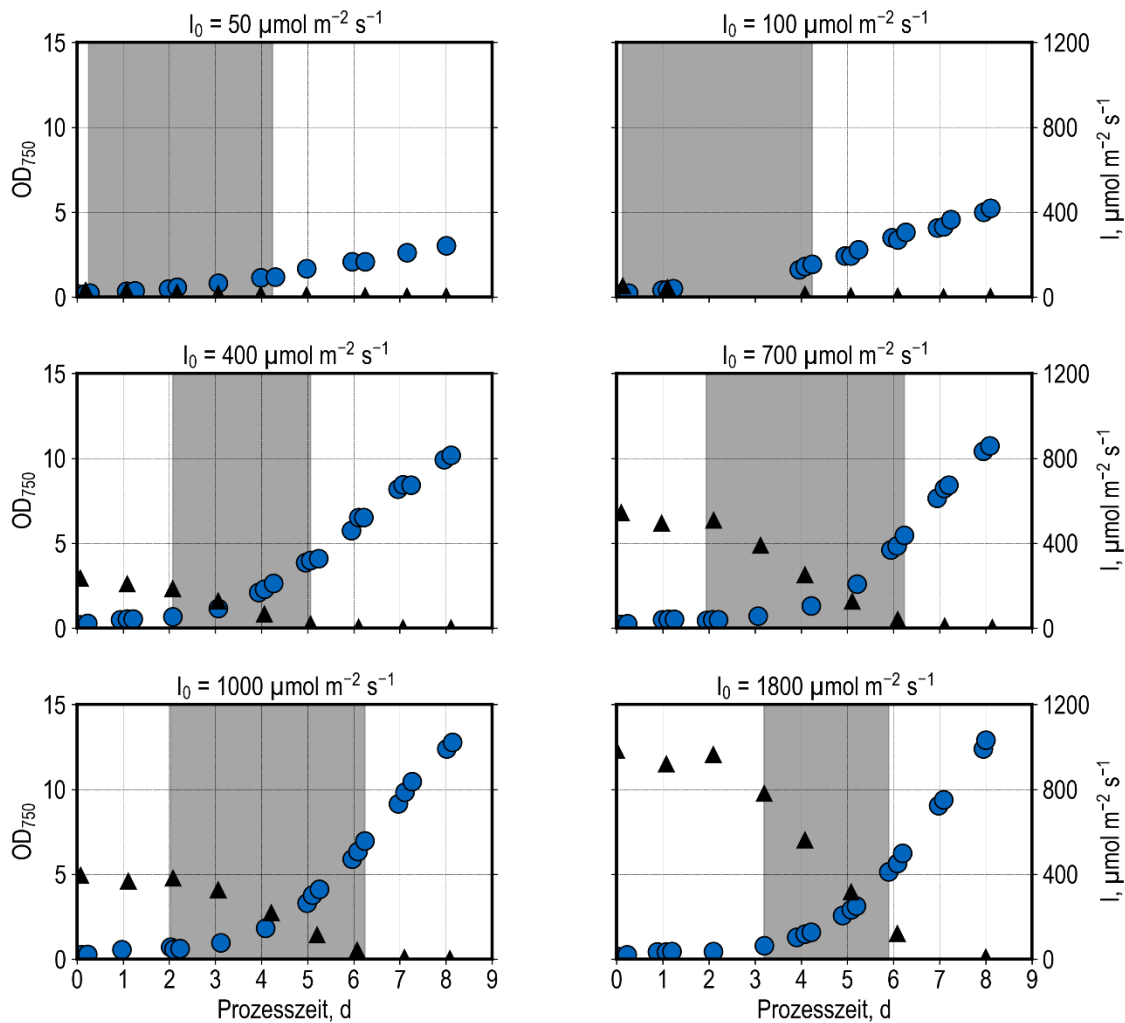


Abb. 35: Photoautotrophe Satz-Kultivierung von *M. salina* in Flachplatten-PBR im L-Maßstab bei sechs verschiedenen Eingangspotenzen I_0 . Jeder Bioreaktor wurde mit 1,8 L *M. salina*-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen OD₇₅₀ von 0,2 gefüllt. Die OD₇₅₀-Messungen sind durch blaue Kreise dargestellt, und die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an. Die Transmission ist durch schwarze Dreiecke dargestellt. Der PBR wurde mit einer konstanten Begasungsrate von 2 L min⁻¹ Druckluft mit 2 % CO₂ betrieben. Die Luft wurde vor dem Eintritt in den PBR befeuchtet. Liegt der pH außerhalb von pH 7,9 – pH 8,1, wird er durch Zugabe von Säure (0,6 M HNO₃) oder Base (3 M NaOH) kontrolliert.

Bei niedrigen Lichtintensitäten von 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tritt nahezu keine Verzögerungsphase auf. Gleichzeitig kommt bereits zu Beginn der Kultivierung kaum Licht durch die Suspension hindurch zur gegenüberliegenden Seite des PBR. Nach knapp 4 d gehen die Zellen von exponentiellem zu linearem Wachstum über, was auf Lichtlimitierung zurückzuführen ist. Bei den Satzprozessen mit 400 – 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist eine Verzögerungsphase von 2 d zu beobachten. Anschließend gehen die Zellen in ein exponentielles Wachstum bis Tag 6 und bei 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis Tag 5 über. Während dieser Wachstumsphase nimmt das durch den PBR transmittierte Licht weiter ab. Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase korreliert mit einer durch die Zellkonzentration deutlich

reduzierten Transmission. Bei $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Eingangsbestrahlungsstärke verlängert sich die Verzögerungsphase um einen weiteren Tag. Mit zunehmender Bestrahlungsstärke können in gleicher Prozessdauer höhere OD_{750} von bis zu 12,9 erreicht werden.

7.2. Lichtabschwächung in PBR

Die Transmissionsmessungen wurden während der Kultivierung im Flachplatten-PBR (siehe Kapitel 7.1) durchgeführt und die Transmission als Funktion der OD_{750} in Abb. 36 dargestellt. Damit können für *M. salina* und für den PBR spezifische Absorptionseigenschaften untersucht werden. Für die Korrelation von Transmission zu OD_{750} werden die beiden Funktionen Lambert-Beer und Lambert-Beer-*r* herangezogen und untersucht.

Lambert-Beer-*r* stellt den modifizierten Ansatz dar, für die ein Parameter für die reaktor-spezifische Absorption hinzugefügt wurde, der die unterschiedlichen Absorptions- und Streueigenschaften verschiedener PBR-Geometrien kompensieren soll. Dieses Lichtabschwächungsmodell wurde hier erstmalig auf seine Konsistenz bei der Beschreibung der Lichtdurchlässigkeit getestet und mit Lambert-Beer verglichen.

Für alle untersuchten Lichtintensitäten im Flachplatten-PBR gilt, dass Lambert-Beer-*r* die dargestellten Messwerte und I_0 deutlich besser beschreibt als das ursprüngliche Lambert-Beer-Gesetz. Letztere Funktion stellt sich als zu steil dar, was auf den Parameter I_0 zurückzuführen ist. I_0 beschreibt die Eingangsbestrahlungsstärke, und stellt im Lambert-Beer-Gesetz mathematisch den Schnittpunkt der Funktion mit der Y-Achse dar. Transmissionsmessungen durch klares Medium, also bei $\text{OD}_{750} = 0$, zeigten jedoch, dass nicht 100 % dieser Bestrahlungsintensität auf der Rückseite des PBR ankommen.

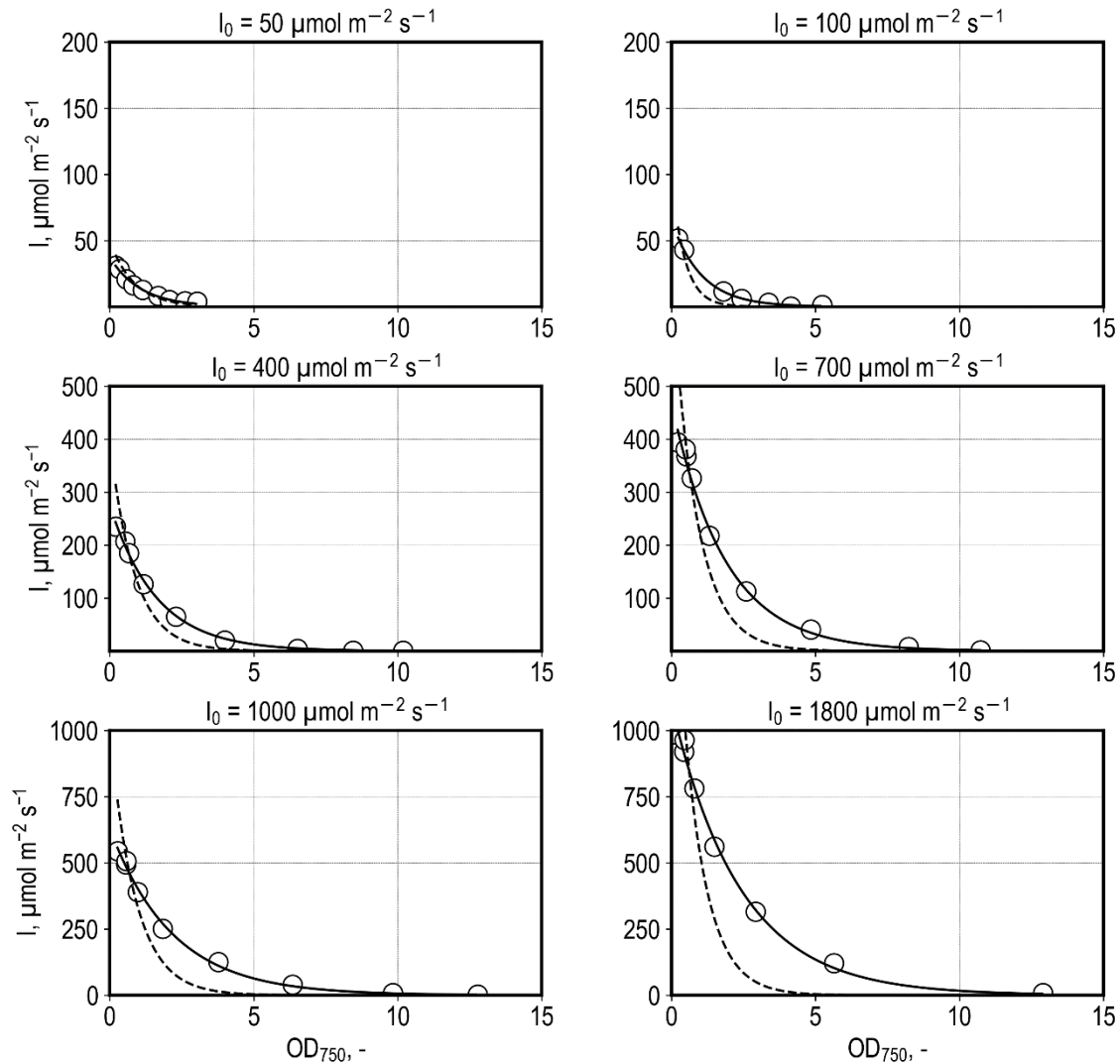


Abb. 36: Transmission I dargestellt als Funktion der OD_{750} . Aufgezeichnet während einer photoautotrophen Satz-Kultivierung von *M. salina* in Flachplatten-PBR im L-Maßstab bei sechs verschiedenen Eingangspotonenflussdichten I_0 . Die Korrelation wurde mit den Funktionen Lambert-Beer (--) und Lambert-Beer-r (-) beschrieben. Neben den dargestellten Punkten war I_0 entsprechend der Angaben und die Schichtdicke L mit 0,02 m vorgegeben.

Bei Lambert-Beer-r übernimmt ein zweiter Parameter r , die reaktorspezifische Absorption und Streuung des Lichts. Die Transmissionsmessungen wurden anschließend für eine der Satzkultivierung in miniaturisierten Rührkesselbioreaktor aus Kapitel 6.1 durchgeführt und in Abb. 37 dargestellt.

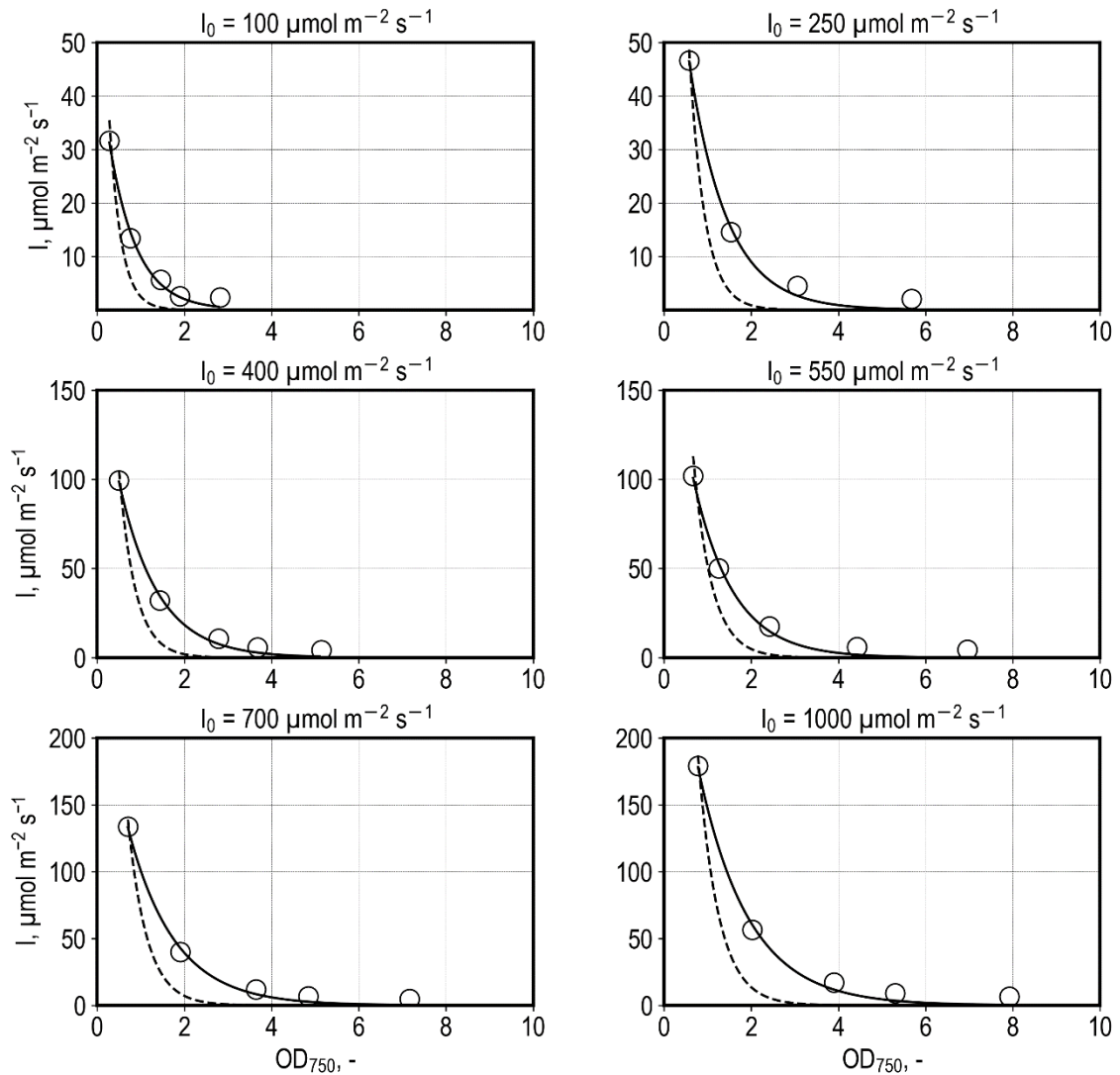


Abb. 37: Transmission I dargestellt als Funktion der OD_{750} . Aufgezeichnet im Rahmen einer photoautotropher Satz-Kultivierung von *M. salina* in Rührkessel-PBR im mL-Maßstab bei sechs verschiedenen Eingangsphotonenflussdichten I_0 . Die Korrelation wurde mit den Funktionen Lambert-Beer (--) und Lambert-Beer-r (-) beschrieben. Neben den dargestellten Punkten war I_0 entsprechend der Angaben und die Schichtdicke L mit $0,032 \text{ m}$ vorgegeben.

Die Korrelation zwischen Transmission und OD_{750} zeigte ein deutlich geringeres Fehlerquadrat bei Verwendung des Ansatzes Lambert-Beer-r im Vergleich zum ursprünglichen Lambert-Beer-Gesetz. Dies war bei beiden Bioreaktortypen der Fall. In Abb. 38 sind die Parameter, die mit dem Ansatz Lambert-Beer-r (siehe Gl. 13) bestimmt wurden, als Funktion der Eingangsphotonenflussdichte I_0 dargestellt.

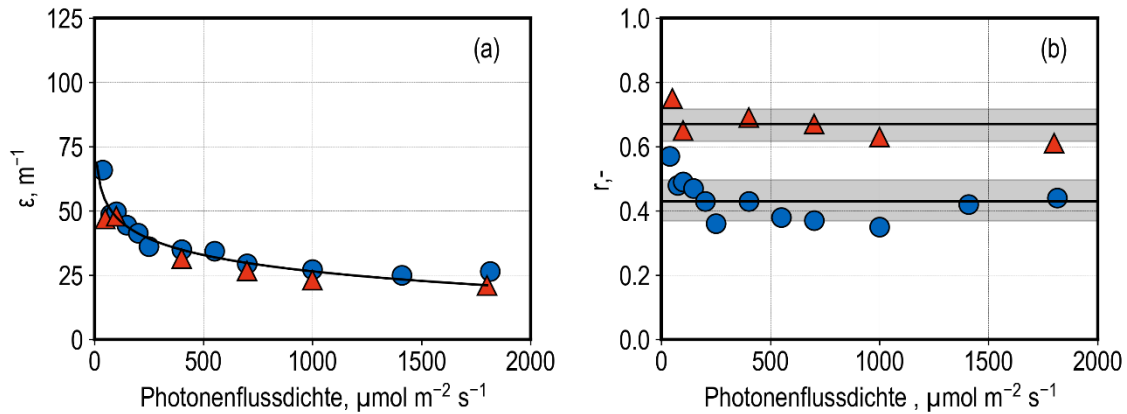


Abb. 38: Darstellung der experimentell ermittelten Modellparameter für die Lichtabschwächung von Rührkessel-PBR (●) und Flachplatten-PBR (▲). Der spezifische Extinktionskoeffizient ε ist in (a) und die spezifische Absorption r der *M. salina*-Zellsuspension ist in (b) aufgetragen. Die schattierten Bereiche zeigen die Standardabweichung an.

Der spezifische Extinktionskoeffizient ε von der überprüften *M. salina*-Zellsuspension liegt zwischen 21 – 66 m^{-1} . Der Extinktionskoeffizient korreliert mit der einfallenden Lichtintensität I_0 . Die Anpassung für ε kann mit einer logarithmischen Funktion (17) beschrieben werden:

$$\varepsilon = -9,177 * \ln(I_0) + 89,861 \quad , R^2 = 0,91 \quad (17)$$

Für den Rührkessel-PBR wurde eine reaktorspezifische Absorption von $r = 0,43$ ermittelt. Für den Flachplatten-PBR wurden höhere Werte von $r = 0,67$ ermittelt.

Diskussion:

Das bevorzugte Modell für die Lichtabschwächung sollte so einfach wie möglich sein, damit es integriert werden kann und analytische Lösungen mit ausreichender Genauigkeit für die mittlere integrale Photonflussdichte bestimmt werden können.

Das in früheren Veröffentlichungen (Pfaffinger et al., 2016b) verwendete Lambert-Beer-Gesetz war nicht in der Lage, die Datenpunkte der Transmissionsmessungen in Flachplatten-PBR und in Rührkessel-PBR zu beschreiben. Eine Anpassung des Modells war daher notwendig. Mit dem vorgestellten Zusatz des Parameters für reaktorspezifische Absorption konnten nicht nur die Transmissionsdaten beschrieben werden, sondern auch eine Funktion für $\varepsilon(I_0)$ definiert werden, die für beide Bioreaktortypen gilt.

Die Änderung des Extinktionskoeffizienten spiegelt die Anpassungen der Mikroalgenzellen an die Intensität des einfallenden Lichts wider. Als Ergebnis einer längeren Exposition gegenüber starkem Licht kann die Produktion von Lipiden und Antioxidantien, einschließlich Carotinoiden, ansteigen, während der Anteil an Chlorophyll abnimmt. Dies kann die Eigenschaften der Lichtabsorption der Zellen verändern (He et al., 2015). Die Produktivität und Lebensfähigkeit der Mikroalgenzellen können durch diese Veränderungen langfristig beeinträchtigt werden. Die Produktion von pigmentreicher Biomasse erfolgt in lichtlimitierten Kulturen (Cerón-García et al., 2002). Diese Veränderungen lassen sich bereits während der Kultivierungen an unterschiedlichen Färbungen der Zellsuspension mit bloßem Auge erkennen.

Die reaktorspezifische Absorption zeigt höhere Werte in Flachplatten-PBR ($r = 0,67$ zu $r = 0,43$). Die höheren Werte sind auf die geometrischen Merkmale der PBR wie das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und die Materialeigenschaften zurückzuführen.

Eine allgemeingültige Funktion für ϵ bietet die Möglichkeit, die Lichtabschwächung durch den Bioreaktor in allen weiteren Experimenten ohne weitere Transmissionsmessungen zu bestimmen. Ob dies zu nachvollziehbaren Ergebnissen führt, wird bei den folgenden Kultivierungen untersucht.

7.3. Skalierbarkeit

Eine weitere Kultivierung im mL-Maßstab wurde durchgeführt, um den Transfer der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der mittleren Lichtverfügbarkeit zu beurteilen. Dafür wurden OD_{750} , Wachstumsrate und Dauer der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt (Abb. 39).

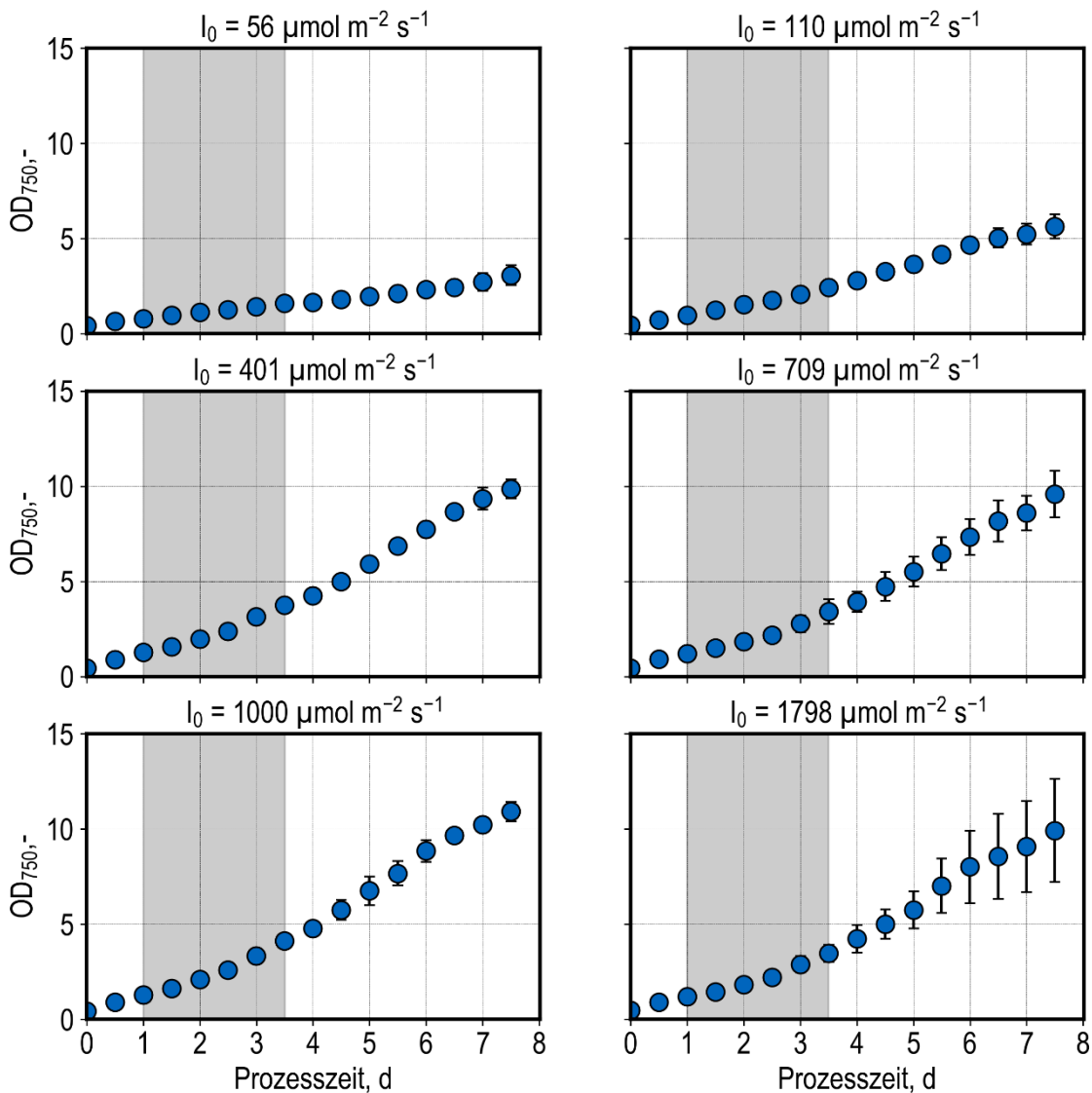


Abb. 39: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierung von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Jede der sechs Reihen aus je acht Bioreaktoren in der Bioreaktoreinheit wurde mit verschiedenen Lichtintensitäten I_0 beleuchtet. Jeder Bioreaktor wurde zunächst mit 10 mL Algen-Suspension in ASW-Medium mit einer anfänglichen $OD_{750,-}$ von 0,5 und anfänglichen pH 8 befüllt. Es wurden magnetisch angetriebene S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO_2 begast. Die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an, die zur Schätzung der einzelnen exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit von den mittleren integralen Lichtintensitäten verwendet wurde.

Bei allen Versuchsansätzen konnte am ersten Tag eine Verzögerungs-Phase beobachtet werden. Daran schließt sich eine Phase exponentiellen Wachstums an. Diese dauerte bei allen Ansätzen 2,5 d, führte aber zu unterschiedlichen Wachstumsraten, die später im Detail beschrieben werden. Das anschließende lineare Wachstum scheint erst ab 6,5 d abzunehmen. Da die Kultivierung nach 7,5 d beendet wurde, können hier keine

weiteren Aussagen getroffen werden. Eine Nährstofflimitierung trat während der Prozesszeit nicht auf. Eine parallele Reproduzierbarkeit war bei allen Versuchsansätzen gegeben. Erst bei der maximalen Lichtintensität von $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ stieg die Standardabweichung der OD_{750} ($n=8$) deutlich an. Die generierten Daten entsprechen den Ergebnissen, die auf den zuvor durchgeführten Kultivierungen (6.1) basieren.

Basierend auf den in Kapitel 7.2 bestimmten Modellparametern zur Lichtabsorption der gewählten Mikroalge und der PBR, sowie den soeben bestimmten exponentiellen Wachstumsphasen und -raten, kann nun die mittlere integrale Photonenflussdichte berechnet werden. In Abb. 40 ist die Wachstumsrate als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte dargestellt. Dabei werden Daten aus den Rührkessel-PBR im mL-Maßstab und im Flachplatten-PBR im L-Maßstab gegenübergestellt und mit Literaturdaten verglichen.

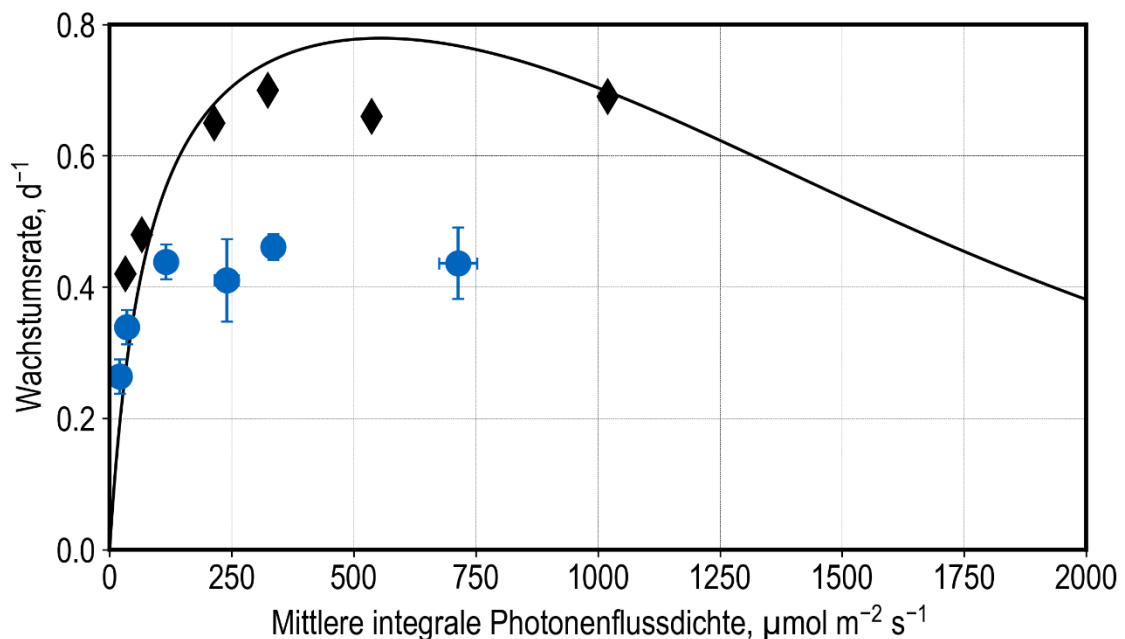


Abb. 40: Exponentielle Wachstumsraten μ in Abhängigkeit von der mittleren integralen Photonenflussdichte I^{**} in unlimitierten Satz-Kultivierungen von *M. salina*. Photoautotrophe Kultivierungen wurden in miniaturisierten Rührkessel-PBRs (\bullet , $n=8$) und Flachplatten-PBRs (\blacklozenge , $n=1$) bei verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt. Darstellung der Wachstumskinetik von *M. salina* in Flachplatten-PBR (-) mit $\mu_{\text{max}}=0,936$, $K_s=80$, $K_i=1780$ und $\varphi=2,5$ (Pfaffinger et al., 2016b).

Zwischen $0 - 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist ein starker und vergleichbarer Anstieg der Wachstumsrate in Abhängigkeit zur Lichtintensität zu erkennen. Die Ansätze flachen ab etwa $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ab und erreichen eine maximale Wachstumsrate μ_{max} , die sich allerdings deutlich unterscheiden.

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} der Kultivierungen in Flachplatten-PBR dieser Arbeit fällt etwas niedriger im Vergleich zur Literatur aus. Deutlicher ist der Unterschied zwischen Flachplatten-PBR und miniaturisierten Rührkessel-PBR, da die maximale Wachstumsrate μ_{\max} der Rührkessel-PBR nur etwa 60 % der anderen erreichen.

Die Wachstumskinetik von *M. salina* in Flachplatten-PBR zeigt, dass auf eine lichtlimitierte Phase eine Phase der Lichtsättigung folgt und schließlich ein weiterer Anstieg der Lichtintensität das Wachstum hemmt (Pfaffinger et al., 2016b). Die in dieser Arbeit untersuchten Lichtintensitäten sind zu gering, um eine Lichtinhibition mit deutlich reduzierter Wachstumsrate zu bewirken. Somit können die Parameter einer Lichtinhibitionskinetik nicht identifiziert werden.

Diskussion:

Die Durchführung der Kultivierungen im Flachplatten-PBR unterscheiden sich in wenigen Details zur Literatur (Pfaffinger et al., 2016b). Die pH-Steuerung erfolgte dort durch die Variation des CO₂-Gehalts zwischen 0 % – 2 % in der Zuluft. Bei steigendem pH wurde automatisiert der Anteil an CO₂ erhöht. Da dies mit der Wachstumsrate und somit Lichtintensität korreliert, wird den Zellen dann mehr CO₂ zur Verfügung gestellt, wenn sie es benötigen. In dieser Arbeit wurde ein konstanter Anteil an CO₂ von 2 % für die gesamte Kultivierung verwendet und der pH mittels Titration geregelt.

Bei Pfaffinger et al. (2016) wurde auf der lichtabgewandten Seite des Flachplatten-PBR eine dunkelgraue Matte befestigt. Diese diente dazu, den Sensor für Transmissionsmessungen zu befestigen und das Einstrahlen von Licht aus fremden und nicht definierten Quellen zu verhindern. Mehrere Messungen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten mit begastem Medium zeigten, dass mit der angebrachten Matte 6,4 % des transmittierten Lichts wieder in Richtung der Kultivierungskammer reflektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde der Sensor an der ersten Glasscheibe des Flachplatten-PBR mit Sensor in Richtung des Bioreaktors befestigt. Bei der Messung ohne Matte wurden 4,8 % des transmittierten Lichts reflektiert.

Dies führt zur Hypothese, dass der Unterschied der Wachstumsrate des Flachplatten-PBR bei $I^{**} \sim 550$ zur dargestellten Wachstumskinetik aus der Literatur, auf eine erhöhte und gleichmäßigere Beleuchtung der Algensuspension durch die verwendete Matte zurückzuführen ist.

Bei niedrigen Lichtintensitäten sind die Wachstumsraten der beiden PBR-Typen vergleichbar. Die Daten des Rührkessel-PBR flachen jedoch bereits ab $I^{**} \sim 115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $\mu_{\text{max}} \sim 0,44 \text{ d}^{-1}$ ab. Dieser Wert wird bei steigender Lichtintensität in etwa gehalten, was auf eine weitere Limitierung schließen lässt. Dies führt zur Hypothese, dass der Unterschied der Wachstumsrate des Rührkessel-PBR zu den Satz-Kultivierungen in Flachplatten-PBR auf eine CO_2 -Limitierung bei hohen Wachstumsraten zurückzuführen ist.

Die Begasung der Flüssigphase ist für photoautotrophe Prozesse wichtig um CO_2 in die Flüssigphase einzubringen und O_2 aus der Flüssigphase auszutragen. Im 10 mL-Maßstab erfolgt der Gas-flüssig-Stofftransport allein über Oberflächen-Begasung. Grundsätzlich beruht die Oberflächenbegasung auf der Diffusion an der Grenzfläche zwischen der Luftphase im Kopfraum und der Flüssigphase des Reaktors. Mit zunehmendem Volumen der Flüssigphase nimmt die Grenzfläche und somit auch der Stoffübergang proportional ab, sodass die Methode der Oberflächenbegasung nur in kleinen Bioreaktoren sinnvoll ist (Kempken et al., 2018). Durch das Rühren bildet sich eine Trombe aus, die die Stoffaustauschfläche vergrößert und die gesättigten Flüssigkeitsschichten ständig durchmischt.

Bei einer Volumenbegasung, wie beim Flachplatten-PBR, wird der eingeleitete Gasstrom durch einen Gasverteiler im PBR dispergiert. Die Gasblasen verfügen über eine größere Stoffaustauschfläche als die Flüssigkeitsoberfläche der Algensuspension. Je kleiner die Blasen sind, desto größer ist das Verhältnis von deren Oberfläche zum Gasvolumen.

Der Vergleich der Kultivierungen in Rührkessel-PBR zu Flachplatten-PBR zeigte, dass dieser zwar den gleichen Anteil von 2 % CO_2 in der Begasung aufweisen, allerdings mutmaßlich eine kleinere Stoffaustauschfläche und somit schlechterer Stofftransport. Dies scheint im dargestellten Rührkessel-PBR bei Wachstumsraten $< 0,4 \text{ d}^{-1}$ unproblematisch, könnte jedoch bei größeren Wachstumsraten zu einer CO_2 -Limitierung führen in dessen Folge die Zellen nicht schneller wachsen können.

Erfolgreich skalierte Experimente mit *M. salina* wurden bereits unter Verwendung von mittleren integralen Photonenflussansichten durchgeführt. Die Skalierung wurde von Flachplatten-PBR (2 L, 20 mm) zu Flachgerinne-PBR (65 L, 6 mm) durchgeführt und zeigt somit eine Veränderung des Energieeintrags und der Schichtdicke (Pfaffinger et al., 2019).

Werden PBR mit nahezu identischen Schichtdicken (20 & 22mm) und Oberflächen-Volumen-Verhältnissen für das Skalieren verwendet, kann die Bestimmung der mittleren integralen Photonenflussdichte entfallen. Trotz dieser idealen Bedingungen können die Ergebnisse der Kultivierungen durch z.B. verstärkte Biofilmbildung negativ beeinflusst werden (Koller et al., 2018).

8. Skalierbarkeit photoautotropher Satzprozesse mit *S. ovalternus*

Die neu entwickelte Beleuchtungseinheit und die neuen Methoden für eine photoautotrophe Prozessführung in miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren wurden mit einem zweiten Mikroalgen-Stamm validiert werden.

8.1. Photoautotrophe Kultivierung von *S. ovalternus* in Flachplatten-PBR im L-Maßstab

Es wurden Kultivierungen mit *S. ovalternus* im Flachplatten PBR als Referenz durchgeführt (Abb. 41).

Es ist in keinem der Versuchsansätze eine Verzögerungsphase zu erkennen. Die Mikroalgen zeigen ab Beginn der photoautotrophen Satzkultivierung ein exponentielles Wachstum, dessen Rate abhängig von der Beleuchtungsstärke ist. Die Wachstumsraten liegen zwischen $0,5 - 2,51 \text{ d}^{-1}$. Mit größerer Eingangsphotonenflussdichte I_0 nimmt auch die Wachstumsrate zu. Nach $1 - 2 \text{ d}$ nimmt die Wachstumsrate deutlich ab. Eine lineare Wachstumsphase ist bei $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nach etwa $1,5 - 2 \text{ d}$ zu erkennen. Die übrigen Versuchsansätze zeigen eine deutliche Absenkung der Zunahme der OD_{750} bereits nach etwas über einem Tag. Bei den Versuchsansätzen mit einer I_0 von $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ist eine Annäherung an $\text{OD}_{750} 6$ zu erkennen, was auf eine Limitation im Medium zurückzuführen sein könnte.

Die Transmission zu Beginn der Kultivierungen ist direkt abhängig von der Eingangsphotonenflussdichte. Bei I_0 von $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ oder $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ kommt schon zu Beginn der Satzkultivierung kaum Licht durch den PBR hindurch ($21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Die Abnahme der Intensität des transmittierten Lichts erfolgt entsprechend des Zellwachstums nur langsam. Bei höheren I_0 ist die Transmission klar messbar und sinkt bei allen Ansätzen innerhalb von etwa einem Tag ab und nähert sich innerhalb eines weiteren Tages einem minimalen Wert zwischen $2 - 34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ an.

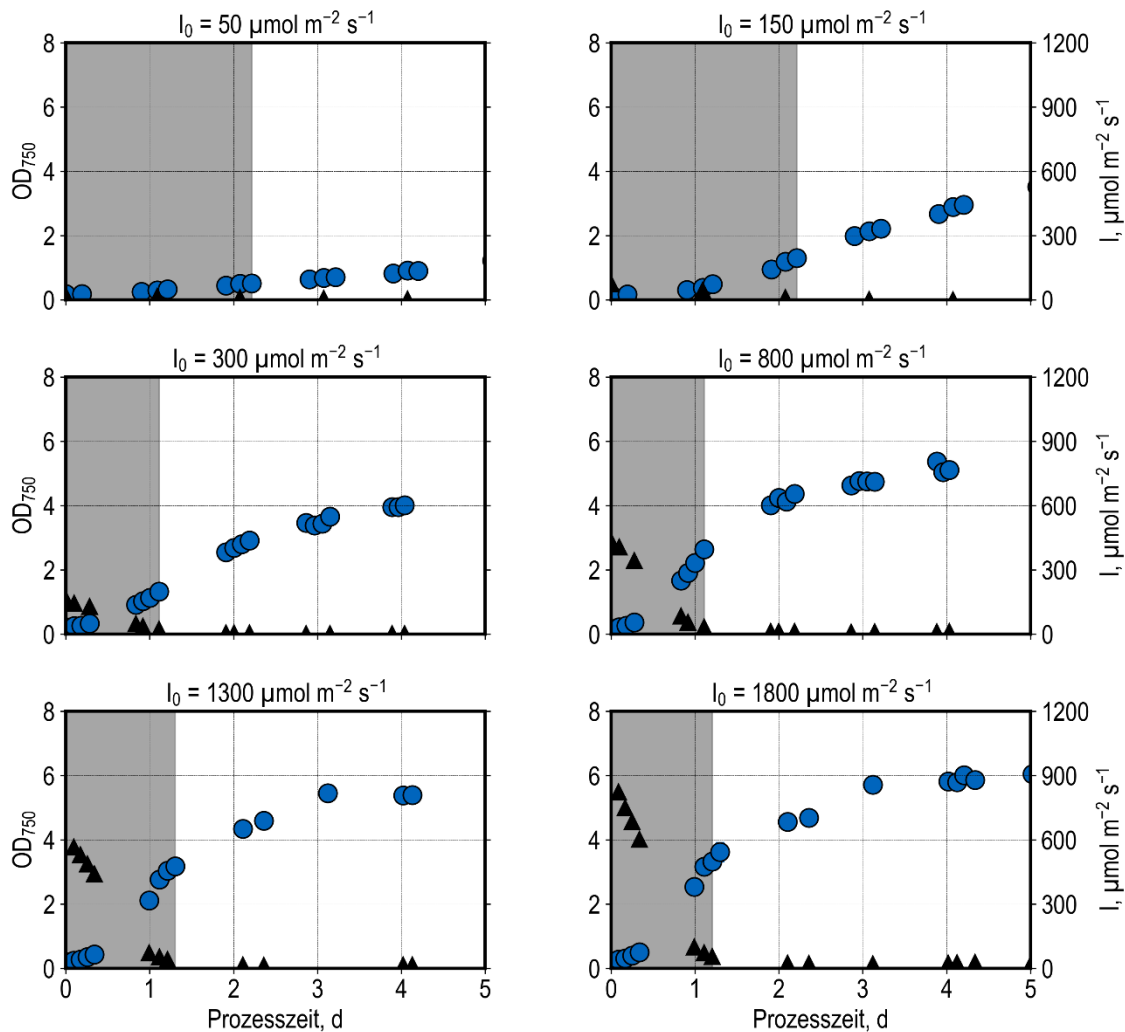


Abb. 41: Photoautotrophe Satz-Kultivierung von *S. ovalternus* in Flachplatten-PBR im L-Maßstab bei sechs verschiedenen Lichtintensitäten I_0 . Jeder Bioreaktor wurde mit 1,8 L *S. ovalternus*-Suspension in BG-11-Medium mit einer anfänglichen OD₇₅₀ von 0,2 gefüllt. Die OD₇₅₀-Messungen sind durch blaue Kreise dargestellt, die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an. Die Transmission ist durch schwarze Dreiecke dargestellt. Der PBR wurde mit einer konstanten Begasungsrate von 2 L min⁻¹ Druckluft mit 2 % CO₂ betrieben. Die Luft wurde vor dem Eintritt in den PBR befeuchtet. Lag der pH außerhalb von pH 7,9 – pH 8,1, wurde er automatisiert durch Zugabe von Säure (0,6 M HNO₃) oder Base (3 M NaOH) angepasst.

8.2. Lichtabschwächung

Transmissionsmessungen während der Satzkultivierungen von *S. ovalternus* in Flachplatten-PBR (Kapitel 8.1) und miniaturisierten Rührkessel-PBR (nicht dargestellt) wurden mittels Lambert-Beer- r -Ansatz ausgewertet (vergleiche Kapitel 7.2) und die so bestimmten Modellparameter in Abb. 42 dargestellt.

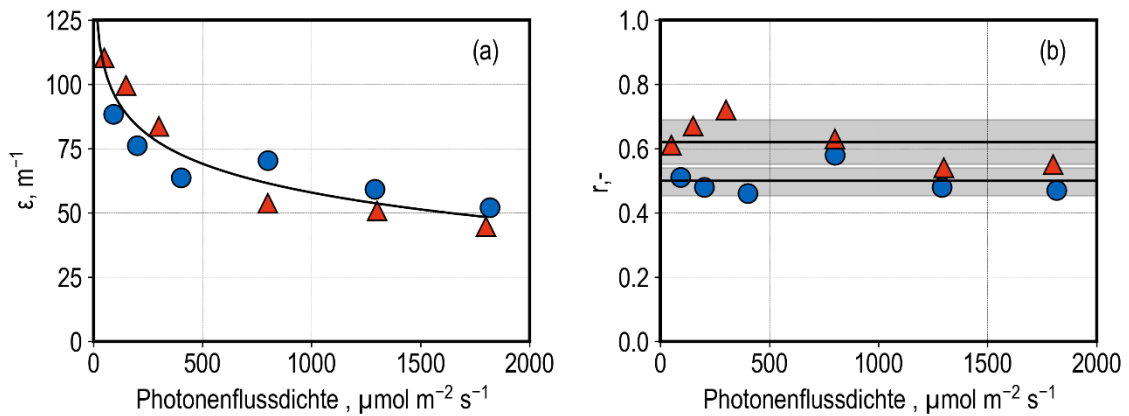


Abb. 42: Darstellung der experimentell ermittelten Modellparameter für die Lichtabschwächung von Rührkessel-PBR(●) und Flachplatten-PBR(▲). Der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ ist in (a) und die reaktorspezifische Absorption r der *S. ovalternus*-Suspension ist in (b) aufgetragen. Die schattierten Bereiche zeigen die Standardabweichung an.

Der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ von *S. ovalternus* liegt zwischen 45 – 110 m⁻¹. Der Extinktionskoeffizient korreliert mit der einfallenden Lichtintensität I_0 . Die Korrelation für ϵ kann mit einer logarithmischen Funktion (18) beschrieben werden:

$$\epsilon = -16,18 * \ln(I_0) + 169,66 \quad , R^2 = 0,88 \quad (18)$$

Für den miniaturisierten Rührkessel-PBR wurde eine reaktorspezifische Absorption von $r = 0,5 (\pm 0,044)$ und für den Flachplatten-PBR wurde ein höherer Wert von $r = 0,62 (\pm 0,069)$ ermittelt.

Diskussion:

Auch bei dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ von *S. ovalternus* ist eine Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke zu erkennen. Der Verlauf ist vergleichbar mit dem von *M. salina* und kann ebenso mit einer logarithmischen Funktion beschrieben werden. Dennoch sind hier deutlich höhere Werte als bei *M. salina* zu erkennen und somit stamm-spezifische Unterschiede nachgewiesen.

Die reaktorspezifische Absorption r zeigt auch hier höhere Werte im Flachplatten-PBR. Im Vergleich mit *M. salina* sind leicht unterschiedliche Werte zu erkennen (0,67 und 0,62), womit r nicht völlig unabhängig vom Stamm zu sein scheint.

Sowohl die Bestimmung von ε als auch von r weisen Fehler auf, die auch auf die komplexe Methode zur Bestimmung der Transmission und auf biologische Variationen zurückzuführen sind. Die Bestimmung von r weist eine etwas geringere Standardabweichung im Vergleich zu *M. salina* auf.

8.3. Skalierbarkeit

Zur Bewertung der Skalierbarkeit wurde das photoautotrophe Wachstum in 48 parallelen Rührkessel-PBR aufgezeichnet. Dabei wurden sechs unterschiedliche Bestrahlungsstärken mit $n = 8$ Bioreaktoren untersucht. Für jeden Rührkessel-PBR soll die exponentielle Wachstumsphase identifiziert sowie das entsprechende Zeitintervall und die Wachstumsrate bestimmt werden. Die photoautotrophen Satzprozesse von *S. ovalternus* sind in Abb. 43 dargestellt.

Die Reproduzierbarkeit für acht parallele Rührkessel-PBR wurde nachgewiesen und ist unabhängig von der einfallenden Photonenflussdichte. Die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase lag zwischen 0 und 1 d. Eine Verzögerungsphase konnte nicht festgestellt werden. Nur für PBR mit $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einfallender Photonenflussdichte wurde ein verzögertes Wachstum gemessen. Nach einem Tag wurde eine kurze Phase linearen Wachstums festgestellt, gefolgt von einer weiteren Abnahme des Wachstums. PBR mit einer einfallenden Photonenflussdichten von mehr als $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigen alle einen Anstieg auf $\text{OD}_{750} \sim 6$. Dies lässt auf eine Nährstofflimitierung schließen. Satzkultivierungen bei 56 und $146 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreichen nur eine $\text{OD}_{750} \sim 1,1$ und $\sim 4,0$. Da diese Werte geringer ausfallen trotz gleicher Medienzusammensetzung, kann hier von einer Lichtlimitierung ausgegangen werden, die entsprechend der Photonenflussdichten auftreten.

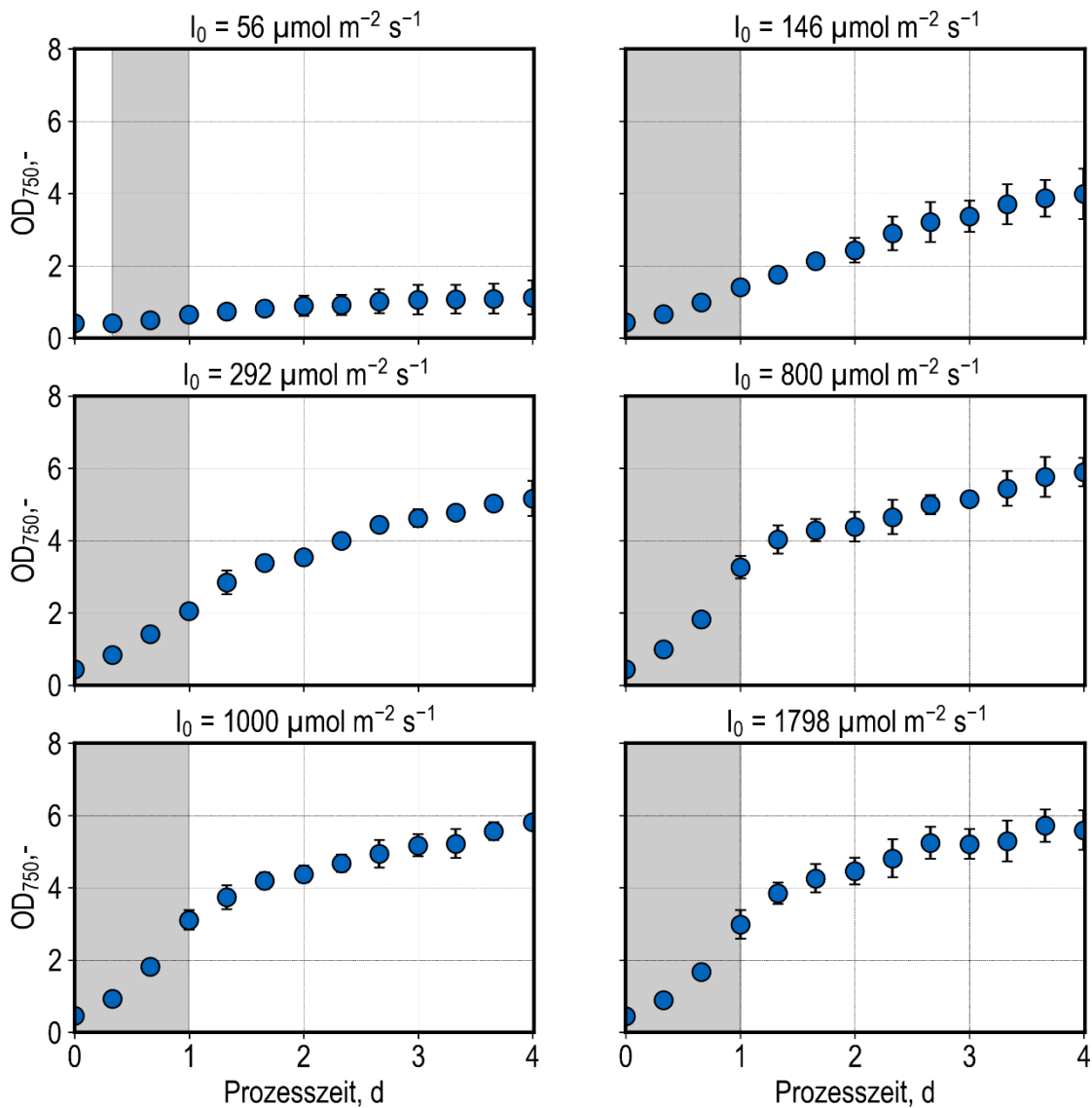


Abb. 43: Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierungen von *S. ovalternus* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Jede der sechs Reihen mit je acht Bioreaktoren wurde mit verschiedenen Lichtintensitäten I_0 beleuchtet. Jeder Bioreaktor wurde anfangs mit 10 mL *S. ovalternus*-Suspension in BG-11-Medium mit einer anfänglichen OD₇₅₀ von 0,5 (anfänglicher pH $8 \pm 0,2$) gefüllt. Es wurden magnetisch induzierte S-Rührer mit 500 U min^{-1} eingesetzt. Der Kopfraum der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde mit 288 L h^{-1} steriler Luft mit 2 % CO₂ begast. Die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an, die zur Schätzung der einzelnen exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit von den mittleren integralen Lichtintensitäten verwendet wurde.

Die Kultivierungen im Flachplatten- und Rührkessel-PBR lieferten Daten zur Wachstumsrate μ , sowie zum Intervall der exponentiellen Wachstumsphase. Die ermittelten Wachstumsraten μ werden in Abb. 44 als Funktion der mittleren integralen Photonendichte I^{**} aufgetragen. Anhand der Ergebnisse soll die Möglichkeit eines Transfers

des Wachstumsverhalten von *S. ovalternus* zwischen den beiden Bioreaktortypen beurteilt werden. Neben den Daten aus hier durchgeführten Kultivierungen ist in Abb. 44 auch eine Wachstumskinetik als Referenz (Koller, Wolf, et al., 2017) aufgetragen.

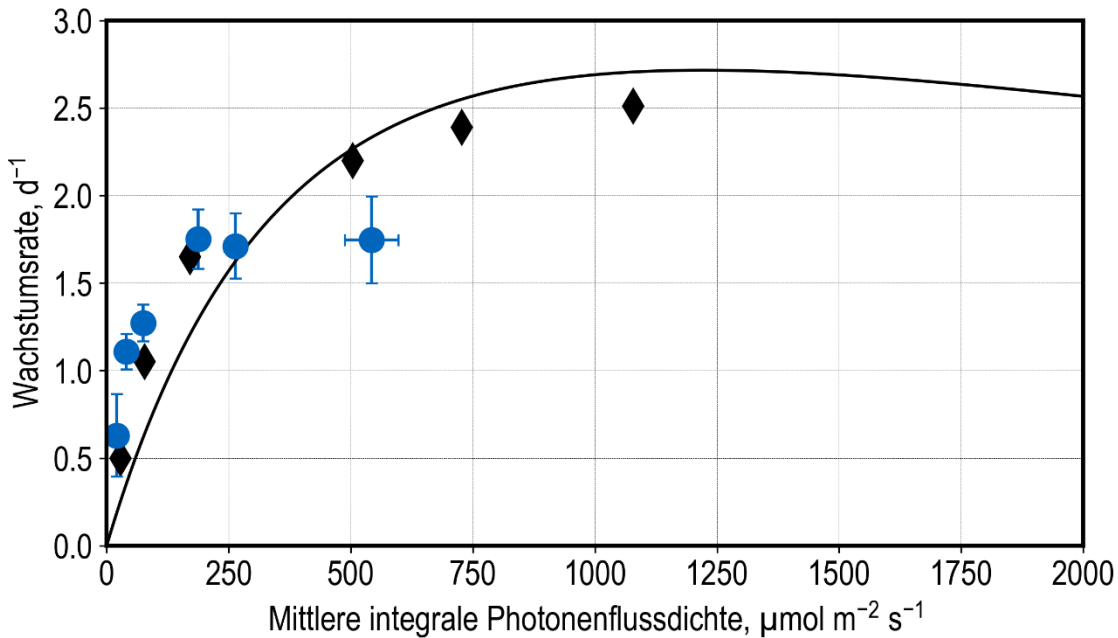


Abb. 44: Exponentielle Wachstumsraten μ in Abhängigkeit von der mittleren integralen Photonenflussdichte I^{**} in unlimitierten Satz-Kultivierungen von *S. ovalternus*. Photoautotrophe Satz-Kultivierungen wurden in miniaturisierten Rührkessel-PBRs (●, $n=8$) und Flachplatten-PBRs (◆, $n=1$) bei verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt. Darstellung der Wachstumskinetik von *S. ovalternus* in Flachplatten-PBR (-) mit $\mu_{\max}=5,14$, $K_s=545$, $K_i=2744$ und $\phi=1$ (Koller, Wolf, et al., 2017).

Bei Kultivierungen mit mittleren integralen Photonenflussdichten von $0 - 190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden in beiden PBR-Typen vergleichbare Wachstumsraten zu beobachten. Die Wachstumsrate bei $\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist im Rührkessel-PBR niedriger als im Flachplatten-PBR. Im Vergleich zur Wachstumskinetik (Koller, Wolf, et al., 2017) liegen die hier gemessenen Wachstumsraten bei $I^{**} < 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etwas höher. Die Wachstumsraten aus den Kultivierungen im Flachplatten-PBR bei $> 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegen etwas unter denen der Kinetik. Beide genannten Aspekte sind mit einer biologischen Varianz des Mikroalgenstamms zu erklären.

Die Erhöhung der mittleren integralen Photonenflussdichte führt bei Kultivierungen im Rührkessel-PBR ab einem Wert von $\sim 190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu keiner weiteren Zunahme der Wachstumsrate.

Bei gleicher maximaler Eingangsphtonenflussdichte I_0 von $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ werden im Rührkessel-PBR deutlich geringere mittlere integrale Photonenflussdichten erreicht von 543 statt $1041 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dies ist in der größeren Schichtdicke von 35 mm statt 20 mm begründet.

Diskussion:

Die dargestellten Wachstumsraten zeigen auch für *S. ovalternus* einen früh stagnierenden Wert bei Kultivierungen im Rührkessel-PBR. Die in Kapitel 7.3 aufgestellte Hypothese der CO_2 -Limitierung bei hohen Wachstumsraten in den Rührkessel-PBR ist somit auch für diesen Stamm anwendbar. Mit dem verwendeten Anteil von 2 % CO_2 in der Begasung sind mit *S. ovalternus* Wachstumsraten $< 1,7 \text{ d}^{-1}$ unproblematisch.

Vergleicht man die beiden Mikroalgenstämme zeigt sich, dass sie unterschiedlich auf hohe Lichtintensitäten reagieren. Dies ist an der eher flachen Kurve von *S. ovalternus* zu erkennen und der stark abfallenden Kurve von *M. salina*, aber auch an der nicht vorhandenen Verzögerungsphase während Kultivierungen von *S. ovaltrnus*. Dies kann auch bei den Versuchen im Flachplatten-PBR beobachtet werden. Bei *M. salina* ist die Verzögerungsphase im Flachplatten-PBR bei hohen Lichtintensitäten deutlich länger (3 d). Außerdem scheint *M. salina* bei hohen Lichtintensitäten zu einer größeren Standardabweichung der gemessenen OD_{750} zu neigen. Dieser Effekt trat bei *S. ovalternus* nicht auf.

Der modifizierte Ansatz Lambert-Beer- r beschreibt die Lichtabschwächung in zwei verschiedenen PBR und liefert gute Schätzungen für eine Skalierung, aber die Vorhersagekraft wird mit zunehmender Schichtdicke wahrscheinlich abnehmen. Alternativ dazu zeigen Modelle, die die Wachstumsrate für jede diskrete Volumenschicht berechnen, gute Ergebnisse für größere Schichtdicken (J.-F. Cornet et al., 1995). Die hier vorgestellten Daten können eine erste Grundlage für weitere Simulationen bilden, aber es wird empfohlen, weitere Mikroalgen und ihre Lichtantwortkurven zu untersuchen und in die Simulationen einzubeziehen. Das vorgestellte System und neue Methoden zur Transmissionsmessung bieten die idealen Voraussetzungen, um solche Modelle sinnvoll zu gestalten.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die nicht nachhaltige Energie- und Landnutzung tragen wesentlich zur globalen Erwärmung bei (Calvin et al., 2023). Mikroalgen können einen Beitrag zur Lösung dieser Probleme leisten da sie die Fähigkeit besitzen, Photosynthese zum Aufbau von Biomasse zu betreiben. Dabei nutzen sie CO₂ als Kohlenstoffquelle und Sonnenlicht als Energiequelle. Mikroalgen bieten somit großes Potential zur Kohlenstoffbindung aus der Atmosphäre, Abgasen aus Industrie und löslichen Carbonaten in Abwässern (B. Wang et al., 2008). Dabei können sie auch auf unfruchtbaren Flächen kultiviert werden, wodurch eine Konkurrenz um Fläche zur Produktion von anderen Nahrungsmitteln vermieden wird (Hannon et al., 2010). Mikroalgen sind keine natürliche Gruppe, sondern kommen in vielen verschiedenen Taxa vor und treten entsprechend heterogen in ihren Eigenschaften auf (Guiry, 2012). Dabei sind Methoden für die Durchmusterung der unterschiedlichen Arten für verschiedene Forschungsfragen relevant wie Biodieselproduktion, pharmazeutische oder agrarwirtschaftliche Anwendungen (Doan et al., 2011; Gerwick et al., 1994; Ördög et al., 2004).

Um Bioprozesse mit Mikroalgen so effektiv wie möglich zu gestalten und ihren wirtschaftlichen Nutzen zu maximieren, ist es wichtig, die Kinetik des photoautotrophen Wachstums und der Produktbildung zu verstehen (Lehr et al., 2012; Yang, 1986). Photobioreaktoren (PBR) im Labormaßstab werden sowohl für physiologische Untersuchungen (Che et al., 2023) unbekannter Mikroalgenstämme verwendet, als auch für die Prozessentwicklung (Schad et al., 2023) und die Bestimmung optimaler Prozessvariablen für Wachstum und Produktbildung.

Es müssen eine Vielzahl an Versuchen durchgeführt werden, um geeignete Stämme zu identifizieren und Prozessbedingungen zu definieren. Für viele Prozesse mit heterotrophen Mikroorganismen, also bei Bioprocessen mit organischen Verbindungen als Energiequelle, ist die Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung von Bioprocessen mittlerweile Standard. Durch weniger Verbrauch an Chemikalien, schnellerer Durchführung und deutlich gesenkten Personalkosten bei guter Skalierbarkeit wird ein rasanter Fortschritt in Forschung und Entwicklung mit diesen Mikroorganismen ermöglicht (Von den Eichen et al., 2021; Weuster-Botz et al., 2005).

Um der Forschung und Entwicklung ein effizientes Durchmusterung unbekannter Mikroalgenstämme und eine schnelle Bestimmung optimaler Prozessvariablen für Wachstum und Produktbildung zu ermöglichen werden also auch PBR benötigt, die miniaturisiert, parallelisiert und automatisiert sind. Alle bekannten miniaturisierten PBR bringen spezi-

fische Nachteile mit sich und erfüllen vor allem den Aspekt der Automatisierung nie zufriedenstellend. Daher ist es Ziel dieser Arbeit eine bereits für heterotrophe Bioprozesse etablierte und automatisierte Mikrobioreaktoreinheit für die photoautotrophe Kultivierung von Mikroalgen verfügbar zu machen. Dabei handelt es sich um eine Bioreaktoreinheit mit 48 parallelen Einweg-Rührkessel-Bioreaktoren im 10 mL-Maßstab (Puskeiler et al., 2005), die hierzu um ein Beleuchtungsmodul zum individuellen Lichteintrag erweitert werden muss. Da die Bioreaktoreinheit bisher ausschließlich für heterotrophe Prozesse verwendet wurde ist die Verteilung von Licht innerhalb einer beleuchteten Algensuspension in diesen miniaturisierten Rührkesselreaktoren vollkommen unbekannt.

Die Wachstumsrate und Produktbildungsrate einer Mikroalgenkultur hängt maßgeblich von der Lichtverfügbarkeit ab. Die Mikroalgenzellen absorbieren das auf den PBR auftreffende Licht, sodass die Lichtverfügbarkeit im PBR deutlich geringer ausfällt als das eingestrahlte Licht. Modelle können die Lichtverteilung im PBR beschreiben, wenn die dafür benötigten Modellparameter bestimmt werden. Dafür wird die einstrahlende Lichtintensität und die Transmission, also die Lichtintensität die nicht von der Algensuspension absorbiert wurde, sowie die Zellkonzentration gemessen.

Für das Beleuchtungsmodul wurde eine weiße LED ausgewählt, deren Spektrum dem des Sonnenlichts sehr ähnelt. Die Helligkeit und Größe der LED erlauben es pro Reaktorposition sechs LEDs zu verbauen. Das finale Beleuchtungsmodul wird unterhalb der Bioreaktoreinheit positioniert und beleuchtet somit den Reaktorboden (siehe Abb. 45 a). Dies führt zu einer homogeneren Beleuchtung der Zellsuspension und ermöglicht einen einfachen modularen Ansatz für die Beleuchtung aller 48 Positionen, trotz des limitierten Platzes. Das Beleuchtungsmodul entspricht in seinen Maßen der Einhausung der Sensoren für die kontaktfreie pH- und DO-Messungen, wie sie sonst unterhalb der Rührkesselreaktoren positioniert sind und für heterotrophe Kultivierungen verwendet werden. So kann das Beleuchtungsmodul ohne einen Umbau an der Bioreaktoreinheit selbst eingesetzt werden (siehe Abb. 45 b). Die LED-Platine sitzt auf einem Aluminiumkörper, der wiederum wassergekühlt ist. So wird die entstehende Wärme der LEDs zuverlässig abtransportiert und eine ideale Temperierung der LEDs ermöglicht.

Die Steuerung des Beleuchtungsmoduls wurde in Form einer autarken Steuerungseinheit umgesetzt, die auf einem Mikrocontroller und Konstantstromquelle basiert. Diese verfügt über einen Bildschirm und Tasten, um die Lichtintensität einstellen und ablesen zu können. Ein konstanter Beleuchtungsmodus ermöglicht ein lineares Dimmen der Bestrahlungsstärke. Der wählbare Bereich entspricht in etwa dem der Lichtintensität der Sonne an einem Sommertag in Südeuropa. Konkret bedeutete dies eine Lichtintensität die stufenlos zwischen $0 - 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gedimmt werden kann. Ein Tag-Nacht-

Beleuchtungsmodus ermöglicht die Lichtintensität basierend auf Wetterdaten einzustellen. Dabei können die LEDs automatisiert auch komplett für den Zeitraum während der Nacht ausgeschaltet werden. Die Wetterdaten müssen dafür im Mikrocontroller gespeichert werden und können dann mit einer 10-minütigen Abtastzeit abgelesen werden. Für die Korrelation zwischen Grad des Dimmens (0 – 100 %) und auf den Boden des PBR treffende Lichtintensität I_0 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurden Messungen der Lichtintensität mit einem Spektrometer vor der Kultivierung einmalig durchgeführt. Das Spektrometer zeichnet das Spektrum und Lichtintensität einer Lichtquelle auf. Das Beleuchtungsmodul wurde einzeln aufgestellt und das Spektrometer mit einer passgenauen Halterung zur reproduzierbaren Positionierung über den LEDs angebracht. Der Abstand des Sensors des Spektrometers entspricht dabei genau dem Abstand, der während einer Kultivierung zwischen eine Gruppe aus 6 LEDs und dem Boden eines Rührkesselreaktors besteht. Die Halterung des Sensors schirmt dabei alle anderen Lichtquellen ab.

Für die photoautotrophe Kultivierung von Mikroalgen waren neben der Konstruktion eines Beleuchtungsmoduls die Anpassung diverser Prozessvariablen notwendig. Die Rührerdrehzahl hat einen Effekt auf die Scherkräfte, die auf die Mikroalgen wirken, auf die Durchmischung der Kultur und durch die Bildung einer Trombe im Rührkesselreaktor auf den Gasaustausch. Das Volumen der Mikroalgenkultur wirkt sich zusätzlich auf die Lichtverteilung im PBR aus. Durch die unveränderliche Grundfläche des miniaturisierten Rührkessel-PBR beeinflusst ein verändertes Volumen direkt die Schichtdicke des PBR. Dies ist die Distanz, die das Licht durch die Mikroalgenkultur durchdringen muss. Die Anwendbarkeit des entwickelten Beleuchtungsmoduls wurde dann mit photoautotrophen Satzprozessen mit der Mikroalge *Microchloropsis salina* (*M. salina*) validiert (siehe Abb. 45 c). Die parallele Reproduzierbarkeit ($n = 8$) des Mikroalgenwachstums lag bei photoautotrophen Satzkultivierungen in Rührkessel-PBR in der gleichen Größenordnung wie bei heterotrophen Bioprozessen. Weiterhin führten unterschiedliche Bestrahlungsstärken zu unterschiedlichen Wachstumsraten und es konnten exponentielle Wachstumsraten bestimmt werden. Dies wurde am Beispiel von photoautotrophen Wachstumsstudien mit *M. salina* mit einer relativen Standardabweichung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750}) von bis zu 10 % im Maximum mit Ausnahme von stark inhibierenden Eingangsphotonenflussdichten von 1400 – 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gezeigt. Eine at-line pH-Kontrolle wurde erfolgreich mittels Fluoreszenzmessungen im MTP-Format (HydroPlate, PreSens GmbH) und Titration umgesetzt, welche automatisiert mit einer Abtastrate von 12 h durch den Pipettierroboter durchgeführt werden. Eine ungleichmäßige Verdunstung in den 48 parallelen PBR hatte zu Beginn durch die lange Versuchsdauer von Mikroalgenkultivierungen zu einer schlechten parallelen Reproduzierbarkeit geführt. Durch einen positionsspezifischen Verdunstungsausgleich konnte das Volumen in allen 48 Positionen über

die gesamte Prozesszeit konstant gehalten werden. Mit einer stündlichen Abtastezeit nimmt der Pipettierroboter innerhalb jedes einzelnen Rührkesselreaktors ein Volumen von 300 μL auf. Die Höhe ist dabei festgelegt und entspricht der Füllstandhöhe, die die Mikroalgensuspension zu Beginn der Kultivierung im PBR aufweist. Durch die Verdunstung nimmt die Füllstandhöhe der Mikroalgenkultur ab und die Pipettierkanäle werden irgendwann auf der definierten Höhe Luft pipettieren. Während des Pipettierens wird der Verlauf des entstehenden Drucks innerhalb des Pipettierkanals aufgezeichnet. Anhand dieses Verlaufs kann verlässlich zwischen der Aufnahme von Luft oder Mikroalgensuspension unterschieden werden. Wird Luft detektiert, wird anschließend 150 μL vollentsalztes Wasser automatisiert hinzugegeben. Alle Zugaben von Wasser werden automatisiert dokumentiert und so die positionsspezifischen Verdunstungsraten berechnet. Die Verdunstungsraten hatten durch die neue Methode keinen beobachtbaren Einfluss auf das Wachstumsverhalten mehr.

Neben Satzprozessen mit konstanter Beleuchtung wurden Satzprozesse mit physikalischer Klimasimulation erfolgreich durchgeführt und zeigten, dass die Kultivierungen mit Klimasimulation auch im mL-Maßstab möglich sind. Dabei wurde der Tagesverlauf der Luft-Temperatur sowie der Eingangs-Lichtintensität eines Sommertages in Südspanien nachgebildet. Für die Lichtintensität wurden die Wetterdaten mit 100 % der hinterlegten Intensität sowie mit 66 % der Intensität ausgeführt, um auch einen bewölkten Tag abzubilden. Die niedrigeren Beleuchtungsstärken führten dabei zu keinen signifikanten Unterschieden im Wachstumsverhalten. Neben der Lichtintensität wurde auch die Temperatur entsprechend der Wetterdaten mit einer stündlichen Abtastezeit variiert.

Es wurden Referenzversuche bei mehreren Lichtintensitäten in einem Flachplatten-PBR im L-Maßstab durchgeführt, wobei die pH-Kontrolle ebenfalls mittels Titration erfolgte. Der Flachplatten-PBR stellt dabei einen typischen Laborbioreaktor mit definierter Schichtdicke (2 cm) dar. Kultivierungen in diesem PBR wurden bereits in größere Maßstäbe skaliert (Koller et al., 2018; Pfaffinger et al., 2019).

In beiden verwendeten PBR wurden Transmissionsmessungen durchgeführt. Mit Modellen zur Lichtverteilung im PBR und den Messungen der Lichtintensität konnten so Absorptionsparameter für die Mikroalgen bestimmt werden. Für Transmissionsmessungen in den Rührkesselbioreaktoren wurde eine off-line Methode entwickelt, die die Messung der Transmission bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen nach einer Satzkultivierung vorsieht. Um die Lichtverteilung in beiden Bioreaktortypen, die sich durch grundlegend unterschiedliche Geometrien auszeichnen, beschreiben zu können, wurde ein Ansatz entwickelt, der das Lambert-Beer-Gesetz um einen Parameter erweitert, der die reaktor-

spezifische Absorption beschreibt. Auf den Modellen zur Lichtverteilung basiert die mittlere integrale Photonenflussdichte. Diese beschreibt eine über die Zeit und Schichtdicke integrierten Wert der Lichtintensität.

Die Wachstumsrate μ als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte I^{**} in der Algensuspension wurde für den Vergleich des Wachstumsverhalten von Mikroalgen in unterschiedlichen PBR untersucht (siehe Abb. 45 d). Die Wachstumsraten μ von *M. salina* zeigten ab einer mittleren integralen Photonenflussdichte von $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deutliche Unterschiede zwischen den PBR auf. Die Wachstumsrate μ im Rührkessel-PBR steigt in keiner Kultivierung auf $> 0,46 \text{ d}^{-1}$, was zur Hypothese führt, dass hier eine zusätzliche Limitierung auftritt. Der Unterschied zwischen Volumenbegasung und Oberflächenbegasung, durch den sich die beiden PBR unterscheiden, führt zur Annahme einer geringeren Gasaustauschfläche im Rührkessel-PBR. Daraus folgt bei gleicher CO_2 -Konzentration in der Begasung eine schlechtere Versorgung der Mikroalgenkultur mit CO_2 . Schließlich kann diese schlechtere Versorgung die Wachstumsrate μ limitieren. Der Vergleich zwischen Satzkultivierungen im Flachplatten-PBR und der Wachstumskinetik aus der Literatur (Pfaffinger et al., 2016a) zeigte übereinstimmende Werte bis auf die Wachstumsrate bei $I^{**} = 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die geringer ausfällt. Dies ist höchstwahrscheinlich auf einen zusätzlichen Lichteintrag bei den Literaturdaten zurückzuführen.

Als zweite Mikroalge wurde *Scenedesmus ovalternus* (*S. ovalternus*) ausgewählt und ebenfalls parallele Satzprozesse durchgeführt. Für die Referenzversuche wurde der Flachplatten-PBR genutzt, mittels Transmissionsmessungen die Absorptionseigenschaften der Mikroalgen bestimmt und das Wachstumsverhalten in zwei unterschiedlichen PBR verglichen. Der Vergleich des Wachstumsverhaltens in beiden PBR zeigte dabei eine gute Übereinstimmung bei Kultivierungen mit mittleren integralen Photonenflussdichten von $0 - 190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Wachstumsrate bei $\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist im Rührkessel-PBR niedriger als im Flachplatten-PBR. Im Vergleich zu den Literaturdaten (Koller, Wolf, et al., 2017) liegen die hier gemessenen Wachstumsraten im Flachplatten-PBR bei $I^{**} < 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ höher. Die Wachstumsraten aus den Kultivierungen im Flachplatten-PBR bei $> 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind vergleichbar zu denen der Literaturdaten. Die Erhöhung der mittleren integralen Photonenflussdichte führt bei Kultivierungen im Rührkessel-PBR ab einem Wert von $\sim 190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu keiner weiteren Zunahme der Wachstumsrate. Somit lässt sich auch für diesen Mikroalgenstamm auf eine CO_2 -Limitierung im Rührkessel-PBR bei hohen Wachstumsraten schließen.

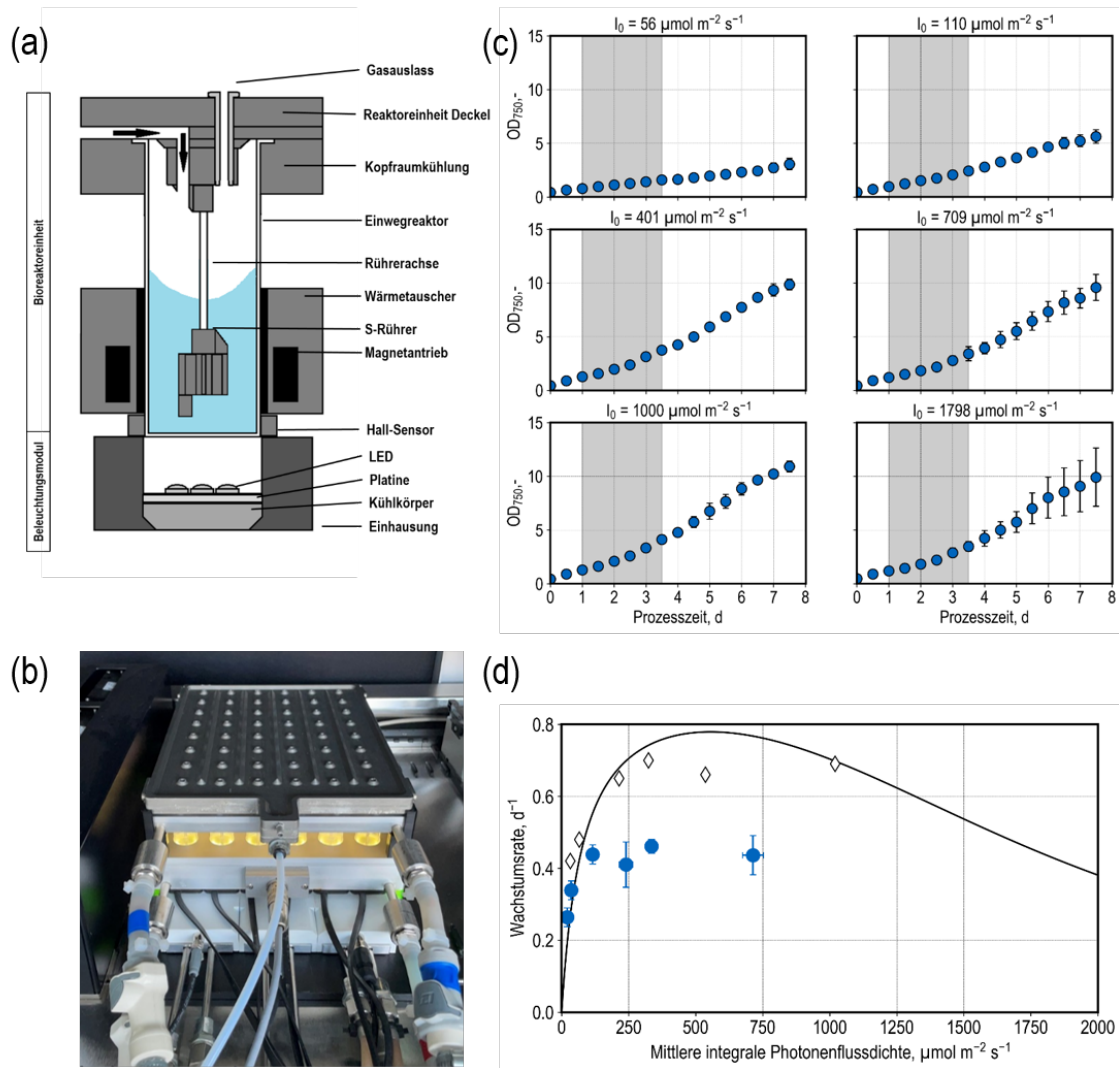


Abb. 45: Photoautotrophe Mikroalgenkultivierung in 48-fach paralleler Bioreaktoreinheit **(a)** Querschnittszeichnung eines miniaturisierten Rührkesselbioreaktors mit Bodenbeleuchtung durch wassergekühltes Beleuchtungsmodul, sechs LEDs pro Reaktorposition, der S-Rührer bildet eine Trombe. **(b)** Das Foto zeigt die Bioreaktoreinheit (bioREACTOR48, 2mag AG, München, Deutschland) mit 48 Einweg-Bioreaktoren besetzt, die über drei Beleuchtungsmodulen positioniert sind. Kopfraum-Kühlung und Kühlung für den magnetinduktiven Antrieb und parallele Rührkessel-Bioreaktoren sind angeschlossen. Gasversorgungsdeckel ist auf der Bioreaktoreinheit angebracht. In den gerührten und beleuchteten Bioreaktoren befinden sich je 10 mL Mikroalgensuspension (*M. salina*). **(c)** Automatisierte photoautotrophe Satz-Kultivierung von *M. salina* in miniaturisierten Rührkessel-PBR. Jede der sechs Reihen aus je acht Bioreaktoren in der Bioreaktoreinheit wurde mit verschiedenen Lichtintensitäten I_0 beleuchtet (pH 8,0, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 U min^{-1} , Begasung 288 L h^{-1} mit 2 % CO_2). Die graue Schattierung zeigt die exponentielle Wachstumsphase an, die zur Schätzung der einzelnen exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit von den mittleren integralen Lichtintensitäten verwendet wurde. **(d)** Exponentielle Wachstumsraten μ als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte I^{**} in Satz-Kultivierungen von *M. salina*. Photoautotrophe Kultivierungen wurden in miniaturisierten Rührkessel-PBRs (●, $n=8$, Daten aus (a)) und Flachplatten-PBR (◆, $n=1$) bei verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt. Darstellung der Wachstumskinetik von *M. salina* in Flachplatten-PBR (-) mit $\mu_{\text{max}}=0,936$, $K_s=80$, $K_i=1780$ und $\phi=2,5$ (Pfaffinger et al., 2016b). Höchstwahrscheinlich ist aufgrund einer CO_2 -Limitierung die Wachstumsrate in den Rührkessel-PBR mit Oberflächenbegasung ab $\mu_{\text{max}} \sim 0,44 \text{ d}^{-1}$ geringer als in Flachplatten-PBR mit Volumenbegasung.

Ausblick:

Eine mögliche technische Weiterentwicklung des Beleuchtungsmoduls ist es, auf die Wasserkühlung zu verzichten. So wie die Wasserkühlung aktuell verbaut und ausgelegt ist, kann sie zuverlässig die LEDs auf einer niedrigen Temperatur, selbst bei der maximalen Beleuchtungsintensität, halten. Gerade bei niedrigen Bestrahlungsstärken oder während der Nacht-Phasen einer Klimasimulation, ist die Wasserkühlung allerdings nicht notwendig. Dies könnte in einer weiteren Iteration des Beleuchtungsmoduls durch einen Temperatursensor und einer passiven oder einer steuerbaren, aktiven Luftkühlung ersetzt werden. Sollte eine Prüfung mittels Temperatursensor zu der Erkenntnis führen, dass auf die Wasserkühlung verzichtet werden kann, könnte ein Thermostat für die LED-Kühlung eingespart werden.

Eine weitere technische Weiterentwicklung stellt die Integration des Beleuchtungsmoduls in einer Prozesssteuerung dar. Über die USB-Schnittstelle kann der Mikrocontroller Befehle erhalten und somit ferngesteuert die LEDs dimmen. Dies würde die Synchronisation aller prozessrelevanten Geräte, wie Pipettierroboter, Bioreaktoreinheit, Thermostat und Beleuchtungsmodul erleichtern und Fehlermöglichkeiten reduzieren.

Das beschriebene Bioreaktorsystem könnte weiterhin für die Untersuchung von phototrophen Co-Kultivierungen genutzt werden. Co-Kultivierungen werden erfolgreich für die (heterotrophe) Herstellung biotechnologischer Produkte verwendet, indem sie durch die Interaktionen von Mikroorganismen beispielsweise günstigere Substrate nutzen können und höhere Produktausbeuten erzielen. Dabei werden üblicherweise zwei unterschiedliche Mikroorganismen in einem Bioreaktor kultiviert (Mittermeier et al., 2023). Als Beispiel für eine photoautotrophe Co-Kultivierung ist das gemeinsame Wachstum von zwei Mikroalgenstämmen zu nennen, die zwei unterschiedliche Omega-3-Fettsäure produzieren. Für eine gesunde Ernährung werden die Omega-3-Fettsäuren Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) im Verhältnis 1:1 empfohlen. Um das gewünschte Verhältnis der Produkte zu erhalten muss das Verhältnis der Zellkonzentrationen beider Stämme während der Kultivierung untersucht werden. Die Co-Kultivierung hat im Vergleich zu den Monokulturen zu einer erhöhten Biomassekonzentration geführt (Thurn et al., 2022). Die Untersuchung von Co-Kultivierungen erfordern durch die unterschiedlichen Verhältnisse der Zellkonzentrationen zum Start der Kultivierung viele Versuchsansätze. Die hohe Anzahl an Rührkesselbioreaktoren der Bioreaktoreinheit erlauben es, eine Vielzahl an Mikroalgenstämmen und Co-Kulturen parallel zu untersuchen. Dabei könnten außerdem unterschiedliche Wetterdaten für Kultivierungen mit einer Tag-Nacht-Simulation der Beleuchtung und Temperatur verwendet werden, um mögliche Produktionsbedingungen in unterschiedlichen Klimazonen zu untersuchen.

Schließlich könnten die verfügbaren Kapazitäten und Fähigkeiten des Pipettierroboters weiter genutzt werden. Bisher wird dieser für die Bestimmung der optischen Dichte, pH-Messung und Kontrolle, sowie Füllstands-Ausgleich verwendet. Es könnten auch at-line Produktaufarbeitungen oder Produktanalysen aus den Bioreaktoren erfolgen. Die automatisierte Produktaufarbeitung und somit ggf. eine Bestimmung der Produktbildungsrate würden als Ergänzung zur Wachstumsrate weitere Einblicke in den zu untersuchenden Bioprozess ermöglichen.

10. Literaturverzeichnis

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *19*(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abou-Shanab, R. A. I., Jeon, B.-H., Song, H., Kim, Y., Hwang, J.-H., Korea, S., & Korea, S. (2014). *Algae-Biofuel: Potential Use as Sustainable Alternative Green Energy*. 4.
- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2015). Continuous background light significantly increases flashing-light enhancement of photosynthesis and growth of microalgae. *Bioresource Technology*, *187*, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.119>
- Adi, P. D. P., Kitagawa, A., Sihombing, V., Silaen, G. J., Mustamu, N. E., Siregar, V. M. M., Sianturi, F. A., & Purba, W. (2021). A Study of Programmable System on Chip (PSoC) Technology for Engineering Education. *Journal of Physics: Conference Series*, *1899*(1), 012163. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1899/1/012163>
- Afonso, N. C., Catarino, M. D., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2019). Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients. *Antioxidants*, *8*(9), 365. <https://doi.org/10.3390/antiox8090365>
- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. (2012). Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative? *Procedia Engineering*, *49*, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.10.131>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier.
- Andrews, J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, *10*(6), 707–723. <https://doi.org/10.1002/bit.260100602>
- Apel, A. C., Pfaffinger, C. E., Basedahl, N., Mittwollen, N., Göbel, J., Sauter, J., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2017). Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate. *Algal Research*, *25*, 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.004>
- Apel, A. C., & Weuster-Botz, D. (2015). Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(6), 995–1008. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1363-1>
- Azizi, S., Bayat, B., Tayebati, H., Hashemi, A., & Shariati, F. P. (2021). Nitrate and phosphate removal from treated wastewater by *Chlorella vulgaris* under various light regimes within membrane flat plate photobioreactor. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *40*(2), e13519. <https://doi.org/10.1002/ep.13519>

- Barolo, L., Abbriano, R. M., Commault, A. S., George, J., Kahlke, T., Fabris, M., Padula, M. P., Lopez, A., Ralph, P. J., & Pernice, M. (2020). Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae. *Cells*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells9030633>
- Beardall, J., & Raven, J. A. (2013). Limits to Phototrophic Growth in Dense Culture: CO₂ Supply and Light. In M. A. Borowitzka & N. R. Moheimani (Eds.), *Algae for Biofuels and Energy* (pp. 91–97). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_5
- Benner, P., Effenberger, S., Franzgrote, L., Kurzrock-Wolf, T., Kress, K., & Weuster-Botz, D. (2020). Contact-free infrared OD measurement for online monitoring of parallel stirred-tank bioreactors up to high cell densities. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107749. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107749>
- Benner, P., Meier, L., Pfeffer, A., Krüger, K., Oropeza Vargas, J. E., & Weuster-Botz, D. (2022). Lab-scale photobioreactor systems: Principles, applications, and scalability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(5), 791–813. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>
- Betts, J. I., & Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: Current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-21>
- Bezerra, R. P., Matsudo, M. C., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & Carvalho, J. C. M. de. (2012). Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Bioenergetic aspects. *Biomass and Bioenergy*, 37, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.11.007>
- Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., & Shelef, G. (2009). Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*, 50(2), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.024>
- Borowitzka, M. A. (2013a). High-value products from microalgae—Their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Borowitzka, M. A. (2013b). Species and Strain Selection. In M. A. Borowitzka & N. R. Moheimani (Eds.), *Algae for Biofuels and Energy* (pp. 77–89). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_4
- Borowitzka, M. A. (2016). Algal Physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. In M. A. Borowitzka, J. Beardall, & J. A. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae* (pp. 601–652). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_23
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (Eds.). (2013). *Algae for biofuels and energy*. Springer.

- Borowitzka, M. A., & Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, 52(4), 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., & Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, 12(1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(87\)90006-0](https://doi.org/10.1016/0144-4565(87)90006-0)
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Bromig, L., von den Eichen, N., & Weuster-Botz, D. (2022). Control of parallelized bioreactors I: Dynamic scheduling software for efficient bioprocess management in high-throughput systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02798-6>
- Buchenauer, A., Hofmann, M. C., Funke, M., Büchs, J., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. (2009). Micro-bioreactors for fed-batch fermentations with integrated online monitoring and microfluidic devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1411–1416. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.043>
- Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barrett, K., Blanco, G., Cheung, W. W. L., Connors, S., Denton, F., Diongue-Niang, A., Dodman, D., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Jones, C., ... Péan, C. (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. (First)*. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647>
- Cantrell, K. B., Ducey, T., Ro, K. S., & Hunt, P. G. (2008). Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Bioresour Technol*, 99(17), 7941–7953. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.061>
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>
- Cerón-García, M. C., Camacho, F., Molina-Grima, E., & Chisti, Y. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 1015–1023.
- Che, S., Du, G., Zhong, X., Mo, Z., Wang, Z., & Mao, Y. (2023). Quantification of Photosynthetic Pigments in *Neopyropia yezoensis* Using Hyperspectral Imagery. *Plant Phenomics*, 5, 0012. <https://doi.org/10.34133/plantphenomics.0012>

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chmiel, H., Takors, R., & Weuster-Botz, D. (Eds.). (2018). *Bioprozesstechnik* (4th ed.). Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54042-8>
- Cordara, A., Re, A., Pagliano, C., Van Alphen, P., Pirone, R., Saracco, G., Branco dos Santos, F., Hellingwerf, K., & Vasile, N. (2018). Analysis of the light intensity dependence of the growth of *Synechocystis* and of the light distribution in a photobioreactor energized by 635 nm light. *PeerJ*, 6, e5256. <https://doi.org/10.7717/peerj.5256>
- Cornet, J. F., Dussap, C. G., Cluzel, P., & Dubertret, G. (1992). A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(7), 826–834. <https://doi.org/10.1002/bit.260400710>
- Cornet, J.-F., Dussap, C. G., Gros, J.-B., Binois, C., & Lasseur, C. (1995). A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 50(9), 1489–1500. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(95\)00022-W](https://doi.org/10.1016/0009-2509(95)00022-W)
- da Silva, T. L., & Reis, A. (2015). Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. In D. Das (Ed.), *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (pp. 125–149). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_6
- de Vera, C., Díaz Crespín, G., Hernández Daranas, A., Montalvão Looga, S., Lillsunde, K.-E., Tammela, P., Perälä, M., Hongisto, V., Virtanen, J., Rischer, H., Muller, C., Norte, M., Fernández, J., & Souto, M. (2018). Marine Microalgae: Promising Source for New Bioactive Compounds. *Marine Drugs*, 16(9), 317. <https://doi.org/10.3390/md16090317>
- Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., & Trösch, W. (2001). A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00350-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00350-9)
- Deniz, I. (2020). Scaling-up of *Haematococcus pluvialis* production in stirred tank photobioreactor. *Bioresource Technology*, 310, 123434. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123434>
- Doan, T. T. Y., Sivaloganathan, B., & Obbard, J. P. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 2534–2544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.021>
- Duck, B. (2018). *Basic measurements of radiation at station Newcastle (2017-11)* [dataset]. PANGAEA. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.896530>
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as

- sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- Dyble, M., Narendran, N., Bierman, A., & Klein, T. (2005). Impact of dimming white LEDs: Chromaticity shifts due to different dimming methods. *Fifth International Conference on Solid State Lighting*, 5941, 291–299. <https://doi.org/10.1117/12.625924>
- Flórez-Miranda, L., Cañizares-Villanueva, R. O., Melchy-Antonio, O., Martínez-Jerónimo, F., & Flores-Ortíz, C. M. (2017). Two stage heterotrophy/photo-induction culture of *Scenedesmus incrustatus*: Potential for lutein production. *Journal of Biotechnology*, 262, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.002>
- Franco-lara, E., Havel, J., Peterat, F., & Weuster-botz, D. (2006). *Model-supported optimization of phototrophic growth in a stirred-tank photobioreactor*. *Biotechnol. Bioeng.*
- Freudenberg, R. A., Baier, T., Einhaus, A., Wobbe, L., & Kruse, O. (2021). High cell density cultivation enables efficient and sustainable recombinant polyamine production in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 323, 124542. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124542>
- Funke, M., Buchenauer, A., Schnakenberg, U., Mokwa, W., Diederichs, S., Mertens, A., Müller, C., Kensy, F., & Büchs, J. (2010). Microfluidic biolector—Microfluidic bioprocess control in microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 497–505. <https://doi.org/10.1002/bit.22825>
- Gayathri, S., Rajasree, S. R. R., Suman, T. Y., Aranganathan, L., Thriuganasambandam, R., & Narendrakumar, G. (2020). Induction of β , ϵ -carotene-3, 3'-diol (lutein) production in green algae *Chlorella salina* with airlift photobioreactor: Interaction of different aeration and light-related strategies. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00580-5>
- Gerwick, W. H., Roberts, M. A., Proteau, P. J., & Chen, J.-L. (1994). Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 143–149. <https://doi.org/10.1007/BF02186068>
- Giordano, M., Beardall, J., & Raven, J. A. (2005). CO₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 99–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052>
- Glemser, M., Heining, M., Schmidt, J., Becker, A., Garbe, D., Buchholz, R., & Brück, T. (2016). Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7144-6>

- Goldman, J. C., Azov, Y., Riley, C. B., & Dennett, M. R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X)
- Granum, E., & Mykkestad, S. M. (2002). A photobioreactor with pH control: Demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Plankton Research*, 24(6), 557–563. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.6.557>
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Pérez, J. A. S., Sevilla, J. M. F., Fernández, F. G. A., & Gómez, A. C. (1994). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology*, 61(2), 167–173. <https://doi.org/10.1002/jctb.280610212>
- Grobbelaar, J. U. (2009). From laboratory to commercial production: A case study of a *Spirulina* (*Arthrospira*) facility in Musina, South Africa. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9378-5>
- Grobbelaar, J. U. (2013). Inorganic Algal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 123–133). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch8>
- Gudin, C., & Chaumont, D. (1991). Cell fragility—The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 145–151. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90146-B](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90146-B)
- Guiry, M. D. (2012). How Many Species of Algae Are There? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Gupta, A. B., & Shrivastava, G. C. (1965). On antibiotic properties of some fresh water algae. *Hydrobiologia*, 25(1), 285–288. <https://doi.org/10.1007/BF00189868>
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., & Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: Challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763–784. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.44>
- Havel, J., Franco-Lara, E., & Weuster-Botz, D. (2008). A parallel bubble column system for the cultivation of phototrophic microorganisms. *Biotechnology Letters*, 30(7), 1197–1200. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9680-y>
- He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.021>
- Heining, M., Sutor, A., Stute, S. C., Lindenberger, C. P., & Buchholz, R. (2015). Internal illumination of photobioreactors via wireless light emitters: A proof of concept. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0290-x>

- Hemmerich, J., Noack, S., Wiechert, W., & Oldiges, M. (2018). Microbioreactor systems for accelerated bioprocess development. *Biotechnology Journal*, 13(4), 1700141. <https://doi.org/10.1002/biot.201700141>
- Ho, T.-Y., Quigg, A., Finkel, Z. V., Milligan, A. J., Wyman, K., Falkowski, P. G., & Morel, F. M. M. (2003). The Elemental Composition of Some Marine Phytoplankton1. *Journal of Phycology*, 39(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-090.x>
- Hoefel, T., Wittmann, E., Reinecke, L., & Weuster-Botz, D. (2010). Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 477–484. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2739-4>
- Hortsch, R., Stratmann, A., & Weuster-Botz, D. (2010). New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3), 443–451. <https://doi.org/10.1002/bit.22706>
- Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2010). Chapter 3—Milliliter-Scale Stirred Tank Reactors for the Cultivation of Microorganisms. In A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 73, pp. 61–82). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)73003-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)73003-3)
- Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2011). Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 69–76. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3036-y>
- Hsu, W.-T., Aulakh, R. P. S., Traul, D. L., & Yuk, I. H. (2012). Advanced microscale bioreactor system: A representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology*, 64(6), 667–678. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9446-1>
- Hu, Q. (2013). Environmental Effects on Cell Composition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 114–122). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch7>
- Huesemann, M. H., Van Wagenen, J., Miller, T., Chavis, A., Hobbs, S., & Crowe, B. (2013). A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1002/bit.24814>
- Hulatt, C. J., Wijffels, R. H., Bolla, S., & Kiron, V. (2017). Production of Fatty Acids and Protein by Nannochloropsis in Flat-Plate Photobioreactors. *PLOS ONE*, 12(1), e0170440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170440>
- Jacobi, A., Steinweg, C., Sastre, R. R., & Posten, C. (2012). *Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics*. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200004>

- Jonker, J. G. G., & Faaij, A. P. C. (2013). Techno-economic assessment of microalgae as feedstock for renewable bio-energy production. *Applied Energy*, *102*, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.053>
- Kaplan, A., & Reinhold, L. (1999). CO₂ Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*(1), 539–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.539>
- Kempken, R., Walz, F., & Howaldt, M. (2018). Kultivierung von Säugetierzellen. In H. Chmiel, R. Takors, & D. Weuster-Botz (Eds.), *Bioprozesstechnik* (pp. 489–544). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54042-8_12
- Kim, H. S., Weiss, T. L., Thapa, H. R., Devarenne, T. P., & Han, A. (2014). A microfluidic photobioreactor array demonstrating high-throughput screening for microalgal oil production. *Lab on a Chip*, *14*(8), 1415–1425. <https://doi.org/10.1039/C3LC51396C>
- Klein, B. C., Bastos, R. G., Filho, R. M., & Maciel, M. R. W. (2021). Effect of light, CO₂ and nitrate concentration on *Chlorella vulgaris* growth and composition in a flat-plate photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00100-x>
- Knorr, B., Schlieker, H., Hohmann, H.-P., & Weuster-Botz, D. (2007). Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, *33*(3), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.023>
- Koller, A. P., Löwe, H., Schmid, V., Mundt, S., & Weuster-Botz, D. (2017). Model-supported phototrophic growth studies with *Scenedesmus obtusiusculus* in a flat-plate photobioreactor: Phototrophic Growth in Flat-Plate Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*(2), 308–320. <https://doi.org/10.1002/bit.26072>
- Koller, A. P., Wolf, L., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2018). Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *41*(2), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1859-y>
- Koller, A. P., Wolf, L., & Weuster-Botz, D. (2017). Reaction engineering analysis of *Scenedesmus ovalternus* in a flat-plate gas-lift photobioreactor. *Bioresource Technology*, *225*, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.025>
- Krujatz, F., Fehse, K., Jahnel, M., Gommel, C., Schurig, C., Lindner, F., Bley, T., Weber, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.018>

- Kuhl, A., & Lorenzen, H. (1964). Chapter 10 Handling and Culturing of Chlorella. In D. M. Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 1, pp. 159–187). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62092-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62092-0)
- Kumari, N., & Singh, R. K. (2019). Biofuel and co-products from algae solvent extraction. *Journal of Environmental Management*, *247*, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.042>
- Lee, H. Y., Erickson, L. E., & Yang, S. S. (1987). Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, *29*(7), 832–843. <https://doi.org/10.1002/bit.260290705>
- Lehr, F., Morweiser, M., Rosello Sastre, R., Kruse, O., & Posten, C. (2012). Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics. *Journal of Biotechnology*, *162*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.002>
- Li, J., Xu, N. S., & Su, W. W. (2003). Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement. *Biochemical Engineering Journal*, *14*(1), 51–65. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00135-3)
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, *18*(4), 160–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5)
- Lorenzen, J., Igl, N., Tippelt, M., Stege, A., Qoura, F., Sohling, U., & Brück, T. (2017). Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(6), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1755-5>
- Lu, X., Cui, Y., Chen, Y., Xiao, Y., Song, X., Gao, F., Xiang, Y., Hou, C., Wang, J., Gan, Q., Zheng, X., & Lu, Y. (2021). Sustainable development of microalgal biotechnology in coastal zone for aquaculture and food. *Science of The Total Environment*, *780*, 146369. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146369>
- Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H., & Fan, J. (2020). Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.590431>
- MacIntyre, H. L., & Cullen, J. J. (2005). Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. *Algal Culturing Techniques*, 287–326.
- Madhubalaji, C. K., Sarat Chandra, T., Chauhan, V. S., Sarada, R., & Mudliar, S. N. (2020). *Chlorella vulgaris* cultivation in airlift photobioreactor with transparent draft tube: Effect of hydrodynamics, light and carbon dioxide on biochemical profile particularly ω -6/ ω -3 fatty acid ratio. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(3), 866–876. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04118-5>

- Maltsev, Y., & Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), 515–547. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 21–36). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., & Tanaka, T. (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. Strain JPCC GA0024 toward biofuel production. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1367–1372. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0029-y>
- Mittermeier, F., Bäumlér, M., Arulrajah, P., Garcia Lima, J. de J., Hauke, S., Stock, A., & Weuster-Botz, D. (2023). Artificial microbial consortia for bio-production processes. *Engineering in Life Sciences*, 23(1), e2100152. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100152>
- Mohammed, K., Ahammad, S. Z., Sallis, P. J., & Mota, C. R. (2014). Energy-efficient stirred-tank photobioreactors for simultaneous carbon capture and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 69(10), 2106–2112. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.123>
- Molina, E., Fernandez, J., Acien, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 19.
- Moreira, J. B., Santos, T. D., Duarte, J. H., Bezerra, P. Q. M., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2021). Role of microalgae in circular bioeconomy: From waste treatment to biofuel production. *Clean Technologies and Environmental Policy*. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02149-1>
- Morschett, H., Schiprowski, D., Rohde, J., Wiechert, W., & Oldiges, M. (2017). Comparative evaluation of phototrophic microtiter plate cultivation against laboratory-scale photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(5), 663–673. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1731-5>
- Nagarajan, D., Lee, D.-J., Chen, C.-Y., & Chang, J.-S. (2020). Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology*, 302, 122817. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817>
- Narayanan, M., Prabhakaran, M., Natarajan, D., Kandasamy, S., Raja, R., Carvalho, I. S., Ashokkumar, V., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Devarayan, K., & Pugazhendhi, A. (2021). Phycoremediation potential of *Chlorella* sp. On the polluted Thirumanimutharu river water. *Chemosphere*, 277, 130246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130246>

- Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M., & Mohanty, R. C. (2016). Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. Using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(1), 7–13. <https://doi.org/10.2323/jgam.62.7>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger, A. L., Beginnen, K., Nelson, D. L., Beginnen, K., Börsch-Supan, M., Glauner, F., Held, A., Jahraus, I., Vogel, S., & Zillgitt, M. (2005). *Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen* (3., vollst. überarb. und erw. Aufl., 1. korrigierter Nachdr). Springer.
- Nowack, E. C. M., Podola, B., & Melkonian, M. (2005). The 96-Well Twin-Layer System: A Novel Approach in the Cultivation of Microalgae. *Protist*, 156(2), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.04.003>
- NREL. (2003). *Reference Air Mass 1.5 Spectra*. <https://www.nrel.gov/grid/solar-resource/spectra-am1.5.html>
- Ocaranza, D., Balic, I., Bruna, T., Moreno, I., Díaz, O., Moreno, A. A., & Caro, N. (2022). A Modeled High-Density Fed-Batch Culture Improves Biomass Growth and β -Glucans Accumulation in *Microchloropsis salina*. *Plants*, 11(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/plants11233229>
- Ogbonna, J. C., Soejima, T., & Tanaka, H. (1999). An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00081-4)
- Ojo, E. O., Auta, H., Baganz, F., & Lye, G. J. (2015). Design and parallelisation of a miniature photobioreactor platform for microalgal culture evaluation and optimisation. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.006>
- Ördög, V., Stirk, W. A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., van Staden, J., Szigeti, J., & Németh, L. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 309–314. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa>
- Øverland, M., Mydland, L. T., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9143>
- Perez-Garcia, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries* (pp. 61–131). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3
- Pfaffinger, C. E., Schöne, D., Trunz, S., Löwe, H., & Weuster-Botz, D. (2016a). Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Algal Research*, 20, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.002>

- Pfaffinger, C. E., Schöne, D., Trunz, S., Löwe, H., & Weuster-Botz, D. (2016b). Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Algal Research*, 20, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.002>
- Pfaffinger, C. E., Severin, T. S., Apel, A. C., Göbel, J., Sauter, J., & Weuster-Botz, D. (2019). Light-dependent growth kinetics enable scale-up of well-mixed phototrophic bioprocesses in different types of photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 297, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.003>
- Pruvost, J., & Cornet, J.-F. (2012). Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. In C. Posten & C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potential and Production* (pp. 181–224). De Gruyter. <https://hal.science/hal-02539915>
- Pruvost, J., Le Borgne, F., Artu, A., Cornet, J.-F., & Legrand, J. (2016). Chapter Five—Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts. In J. Legrand (Ed.), *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 48, pp. 257–310). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.002>
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T., & Weuster-Botz, D. (2005). Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): Reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(3), 227–235. <https://doi.org/10.1042/BA20040197>
- Rajesh Banu, J., Preethi, Kavitha, S., Gunasekaran, M., & Kumar, G. (2020). Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy—techno economic and life-cycle analysis. *Bioresource Technology*, 302, 122822. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122822>
- Reyna-Velarde, R., Cristiani-Urbina, E., Hernández-Melchor, D. J., Thalasso, F., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2010). Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(1), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.11.014>
- Reynolds, H. L., & Pacala, S. W. (1993). An Analytical Treatment of Root-to-Shoot Ratio and Plant Competition for Soil Nutrient and Light. *The American Naturalist*, 141(1), 51–70. <https://doi.org/10.1086/285460>
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: An overview. In P. O. Ang (Ed.), *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges* (pp. 33–37). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_5
- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Richmond, A. (2013). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 169–204). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>

- Riedlberger, P., & Weuster-Botz, D. (2012a). New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*, *106*, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.019>
- Riedlberger, P., & Weuster-Botz, D. (2012b). New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*, *106*, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.019>
- Sadava, D. E., Purves, W. K., Hillis, D. M., Heller, H. C., Hacker, S. D., & Markl, J. (2019). *Purves Biologie* (A. Held, B. Jarosch, L. Seidler, M. Niehaus, E. Sixt, & M. Delbrück, Trans.; 10. Auflage). Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58172-8>
- Safafar, H., Hass, M. Z., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2016). High-EPA Biomass from *Nannochloropsis salina* Cultivated in a Flat-Panel Photo-Bioreactor on a Process Water-Enriched Growth Medium. *Marine Drugs*, *14*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/md14080144>
- Schad, A., Wagner, H., & Wilhelm, C. (2023). Optimising biotechnological glycolate production in *Chlamydomonas reinhardtii* by improving carbon allocation towards the product. *Chemical Engineering Journal*, *459*, 141432. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141432>
- Schädler, T., Caballero Cerbon, D., de Oliveira, L., Garbe, D., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2019). Production of lipids with *Microchloropsis salina* in open thin-layer cascade photobioreactors. *Bioresource Technology*, *289*, 121682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121682>
- Schädler, T., Thurn, A.-L., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2021). Continuous Production of Lipids with *Microchloropsis salina* in Open Thin-Layer Cascade Photobioreactors on a Pilot Scale. *Energies*, *14*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/en14020500>
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., & Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, *1*(1), 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Schipper, K., Al-Jabri, H. M. S. J., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2021). Techno-economics of algae production in the Arabian Peninsula. *Bioresource Technology*, *331*, 125043. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125043>
- Schmideder, A., Hensler, S., Lang, M., Stratmann, A., Giesecke, U., & Weuster-Botz, D. (2016). High-cell-density cultivation and recombinant protein production with *Komagataella pastoris* in stirred-tank bioreactors from milliliter to cubic meter scale. *Process Biochemistry*, *51*(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.024>
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., & Yu, T.-H. (2008). Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use

- Change. *Science*, 319(5867), 1238–1240. <https://doi.org/10.1126/science.1151861>
- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Strillinger, E., Grötzinger, S. W., Allers, T., Eppinger, J., & Weuster-Botz, D. (2016). Production of halophilic proteins using *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred-tank bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1183–1195. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7007-1>
- Suh, I. S., & Lee, S. B. (2003). A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(2), 180–189. <https://doi.org/10.1002/bit.10558>
- Sukenik, A. (1991). Ecophysiological considerations in the optimization of eicosa-pentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technology*, 35(3), 263–269. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90123-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90123-2)
- Talent, M., Burgess, G., & Fernández-Velasco, J. G. (2014). Protocol to compensate net evaporation and net precipitation in open-pond microalgal massive cultures and permit maximal steady-state productivities. *Biomass and Bioenergy*, 64, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.019>
- Thurn, A.-L., Stock, A., Gerwald, S., & Weuster-Botz, D. (2022). Simultaneous photoautotrophic production of DHA and EPA by *Tisochrysis lutea* and *Microchloropsis salina* in co-culture. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00612-5>
- Tillich, U. M., Wolter, N., Schulze, K., Kramer, D., Brödel, O., & Frohme, M. (2014). High-throughput cultivation and screening platform for unicellular phototrophs. *BMC Microbiology*, 14, 239. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0239-x>
- Tredici, M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, 1(1), 143–162. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>
- Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., & Huesemann, M. (2012). Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*. *Energies*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/en5030731>
- Vejrazka, C., Janssen, M., Streefland, M., & Wijffels, R. H. (2011). Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2905–2913. <https://doi.org/10.1002/bit.23270>
- Venkata Subhash, G., & Venkata Mohan, S. (2014). Lipid accumulation for bio-diesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of

- critical factors. *Fuel*, 116, 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.035>
- Venkatraman, K. L., & Mehta, A. (2019). Health Benefits and Pharmacological Effects of Porphyra Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0707-9>
- Vester, A., Hans, M., Hohmann, H.-P., & Weuster-Botz, D. (2009). Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1966-z>
- Von den Eichen, N., Bromig, L., Sidarava, V., Marienberg, H., & Weuster-Botz, D. (2021). Automated multi-scale cascade of parallel stirred-tank bioreactors for fast protein expression studies. *Journal of Biotechnology*, 332, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.021>
- Wagner, I., Steinweg, C., & Posten, C. (2016). Mono- and dichromatic LED illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space. *Biotechnology Journal*, 11(8), 1060–1071. <https://doi.org/10.1002/biot.201500357>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, C., & Lan, C. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986–1002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001>
- Wang, C.-Y., Fu, C.-C., & Liu, Y.-C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.03.004>
- Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1981). Isolation and Growth of Cyanobacteria from Marine and Hypersaline Environments. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, & H. G. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* (pp. 221–223). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_9
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T., & Arnold, M. (2005). Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(2), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0011-6>
- Weuster-Botz, D., & Takors, R. (2018). Wachstumskinetik. In H. Chmiel, R. Takors, & D. Weuster-Botz (Eds.), *Bioprozesstechnik* (pp. 45–70). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54042-8_2
- Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, 329(5993), 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>

- Wolf, L., Cummings, T., Müller, K., Reppke, M., Volkmar, M., & Weuster-Botz, D. (2021). Production of β -carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Engineering in Life Sciences*, 21(3–4), 115–125. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000044>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: An overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817–1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Yang, H. Y. L. and L. E. E. and S. S. (1986). *Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of Spirulina platensis* | *EndNote Click*. <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1002%2Fbit.260290705&token=WzMyMzg0NDUsIjEwLjEwMDIvYml0LjI2MDI5MDcwNSJd.SQEf-KLFjgm0xauc9sm0R2o59A20>
- Zafar, F., Karunatilaka, D., & Parthiban, R. (2015). Dimming schemes for visible light communication: The state of research. *IEEE Wireless Communications*, 22(2), 29–35. <https://doi.org/10.1109/MWC.2015.7096282>

11. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|----------------------|--|
| ASW | Artifizielles Meerwasser (engl. Artificial sea water) |
| BTM | Biotrockenmasse |
| CCR | Konstante Stromreduzierung (engl. constant current reduction) |
| d | Tag |
| DHA | Docosahexaensäure |
| DO | Gelöster Sauerstoff (engl. dissolved oxygen) |
| EPA | Eicosapentaensäure |
| Hz | Hertz, s ⁻¹ |
| L | Liter |
| LED | Leuchtdiode (engl. light emitting diode) |
| <i>M. salina</i> | <i>Microchloropsis salina</i> |
| MBR | Mikrobioreaktoren |
| mL | Milliliter |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| NCMA (ehemals CCMP) | National Center for Marine Algae and Microbiota |
| OD ₇₅₀ | Optische Dichte bei der Wellenlänge 750 nm |
| PAR | Photosynthetisch aktive Strahlung (engl. photosynthetically active radiation) |
| PBR | Photobioreaktor |
| PETG | Polyethylenterephthalat |
| PFD | Photonenflussdichte |
| PWM | Pulsweitenmodulation |
| RAM | Random Access Memory |
| ROM | Read Only Memory |
| SAG | Sammlung von Algenkulturen der Univer- sität Göttingen |
| <i>S. ovalternus</i> | <i>Scenedesmus ovalternus</i> |

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| TPU | thermoplastische Polyurethanfilamente |
| $U \text{ min}^{-1}$ | Umdrehungen pro Minute |
| VE-Wasser | Vollentsalztes Wasser |

Symbolverzeichnis

| Symbol | Bedeutung | Einheit |
|------------------------|---|---------------------------------------|
| μ | Spezifische Wachstumsrate | d^{-1} |
| μ_{\max} | Maximale spezifische Wachstumsrate | d^{-1} |
| c | Lichtgeschwindigkeit | $m \text{ s}^{-1}$ |
| c_x | Biomassekonzentration | $g \text{ L}^{-1}$ |
| dpH | Parameter beeinflusst die Kurvenbreite der sigmoidalen Kalibrierkurve der at-line pH Messung | - |
| E | Energie pro Mol Photonen | $J \text{ mol}^{-1}$ |
| Ei | Integrale exponentialfunktion | - |
| \mathcal{E} | Spezifischer Extinktionskoeffizient | m^{-1} |
| h | Wirkungsquantum | Js |
| I | Verfügbare Photonenflussdichte in Schichttiefe l | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |
| I^* | Integrale Photonenflussdichte | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |
| I^{**} | Mittlere integrale Photonenflussdichte | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |
| I_0 | Eingangspotonenflussdichte | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |
| $I_{\text{indicator}}$ | Fluoreszenzsignal des pH-Indikatorfarbstoffs | - |
| I_{\min}, I_{\max} | I_{\min} und I_{\max} stellen die horizontalen Asymptoten der sigmoidalen Kalibrierkurve der at-line pH Messung dar | - |
| I_R | Intensitätsverhältnis | - |
| $I_{\text{reference}}$ | Fluoreszenzsignal des nicht-pH-sensitiven Referenzfarbstoffs | - |
| k | Korrelationsfaktor Lichtintensität | $\mu\text{mol W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| K_I | Photoinhibitionskonstante | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ |

| | | |
|-----------|--|--------------------------------------|
| K_S | Sättigungskonstante für Photonenflussdichte | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
| l | Länge des optischen Pfads in der Suspension | m |
| L | Schichtdicke | m |
| N_A | Avogadrokonstante | mol^{-1} |
| pH_0 | Wendepunkt der sigmoidalen Kalibrierkurve der at-line pH Messung | - |
| r | Reaktorspezifische Absorption | - |
| R^2 | Bestimmtheitsmaß | - |
| t | Zeit | d |
| t_a | Zeitpunkt definiert den Beginn des exponentiellen Wachstums | d |
| t_e | Zeitpunkt definiert das Ende des exponentiellen Wachstums | d |
| λ | Wellenlänge | nm |
| φ | Sensitivitätsparameter | - |

12. Anhang

Tabelle A. 1 Verwendete Geräte

| Komponente | Produkt und Hersteller |
|--------------------------------|---|
| Analysewaage | XA204, Mettler Toledo, Gießen, DE |
| Autoklav | V-150, Systec, Linden, DE |
| Bioreaktoreinheit | bioREACTOR48, 2mag AG, München, DE |
| Filament Drucker | Prusa i3 MK3, Prusa, Prag, Tschechische Republik |
| Flachplatten-Photobioreaktoren | Labfors 5 LUX, Infors HT, Bottmingen, CH |
| Gasmischstation | DASGIP MX 4/4, Eppendorf SE, Hamburg, DE |
| Inkubator | Labfors HT, Infors HT, Bottmingen, CH |
| Miniaturspektrometer | FLAME, Ocean Optics, Ostfildern, DE |
| MTP-Photometer | Synergy HTX, Biotek, Winooski, VT, USA |
| MTP-Plattenwaschgerät | 405 LS, Biotek, Winooski, VT, USA |
| pH-Meter | Lab 870, Schott Instruments, Mainz, DE |
| pH-Sonde | VisiFerm DO ECS 120 H0, Hamilton Germany GmbH, Gräfelfing, DE |
| Pipettierroboter | Microlab STARlet, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH |
| pO ₂ -Sonde | Easyferm Plus ARC, Hamilton Germany GmbH, Gräfelfing, DE |
| Transferpipetten | 20 µL bis 10 mL, Brand, Wertheim, DE |
| Trockenschrank | UN260 Memmert, Schwabach, DE |
| Vakuumpumpe | Laboport N 938.50 KN18, KNF Group, Freiburg, DE |

Tabelle A. 2 Verwendete Komponenten für das Beleuchtungsmodul und Steuereinheit

| Komponente | Produkt und Hersteller |
|----------------------------|--|
| Druckknöpfe | Taktile Schalter, Chala |
| Druckschalter | S 1323 RT, Reichelt, Sande, DE |
| Konstantstromquelle | LDD-300H, Mean Well, TWN |
| LED | NF2W757GT-F1 Optisolis 5000 K, Nichia Corporation, Anan, JP |
| Microcontroller | Raspberry Pi Pico, Raspberry Pi Foundation, UK |
| Netzteil | 31 V, 1450 mA, - |
| OLED Display | 1,3 Zoll OLED Display I2C SSH1106 Chip, AZdelivery Vertriebs GmbH, Degendorf, DE |
| Schraubklemme | 5mm 2-Pin |
| Spannungswandler | TSR-1, Traco Electronic AG, Baar, CH |
| Verbindungsklemmen | 221-412, Wago GmbH & Co. KG, Minden, DE |
| Widerstand | 10 k Ω , Elegoo, Shenzhen, CN |
| Schneidringverschraubungen | G ¼ " – 6 L, Stahl verzinkt, Landefeld, Kassel, DE |
| Aufschraub-Schlauchtüllen | G ¼ ", Edelstahl, Landefeld, Kassel, DE |

Verwendete Materialien und Chemikalien

Tabelle A. 3 Verwendete allgemeine Materialien.

| Material | Hersteller |
|---------------------------------------|---|
| Allzweck-Aluschalen | PP65.1, Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Büchner-Trichter | Haldenwanger, Waldkraiburg, DE |
| Einmalspritzen Omnifix (Luer-Lock) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Glasmikrofaserfilter | GF/C, Waltham, MA, USA, GE Healthcare |
| Küvette, Makro | Ratiolab, Frankfurt a. M., DE |
| Messzylinder, 100 mL, 250 mL, 1 L | Brad, Wertheim, DE |
| Minisart Plus 0,2 µm Spritzenfilter | Sigma Aldrich Merck, Darmstadt, DE |
| Polyethylenterephthalat (PETG) | Extrudr, Lauterach, AT |
| Polyurethanfilamente (TPU hart) | Extrudr, Lauterach, AT |
| Puffer pH 10,01 | Hanna Instruments, Woonsocket, USA |
| Puffer pH 7,01 | Hanna Instruments, Woonsocket, USA |
| Saugflasche 100 mL | Schott, Mainz, DE |
| Spritze | BD Discardit II 10 mL, Becton Dickinson, Heidelberg, DE |
| Spritze | 20 mL Norm,Ject Luer Lock, Henker Sass Wolf, Tuttlingen, DE |
| Sterilfilter | Steritop 45 mm Neck Size, Merck Millipore, Burlington, USA |
| Whatman Glasfaser-Mikrofilter Ø 25 mm | VWR, Radnor, USA |

Tabelle A. 4 Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Summenformel | Hersteller |
|-------------------------------|--|-------------------|
| Ammoniumeisen(III)-Citrat | $\text{FeC}_6\text{H}_{11}\text{NO}_7$ | Merck |
| Ammoniummolybdat-Tetrahydrat | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | Merck |
| Antifoam 204 | | Sigma-Aldrich |
| Borsäure | H_3BO_3 | Merck |
| Calciumchlorid-Dihydrat | $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | Merck |
| Dinatrium-EDTA-Dihydrat | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | Carl Roth |
| Eisen(III)-chlorid Hexahydrat | $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | Carl Roth |
| Kaliumhydrogenphosphat | KH_2PO_4 | neoFroxx |
| Kaliumnitrat | KNO_3 | Merck |
| Kohlenstoffdioxid | CO_2 | Air Liquide |
| Kupferchlorid-Dihydrat | $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | Carl Roth |
| Kupfersulfat-Pentahydrat | $\text{CuO}_4\text{S} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | Merck |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | Carl Roth |
| Manganchlorid-Tetrahydrat | $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | VWR |
| Natriumcarbonat | Na_2CO_3 | Merck |
| Natriumchlorid | NaCl | Merck |
| Natriumhydroxid | NaOH | Carl Roth |
| Natriumnitrat | NaNO_3 | Carl Roth |
| Salpetersäure | HNO_3 | Merck |
| Zinkchlorid | ZnCl_2 | Merck |
| Zinksulfat-Heptahydrat | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | Carl Roth |
| Zitronensäure | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ | Carl Roth |

Tabelle A. 5: Temperatur für Kultivierungen mit Tag- und Nachtzyklen.

| Uhrzeit | Temperatur, °C |
|----------------|-----------------------|
| 6 | 13,9 |
| 7 | 18,3 |
| 8 | 21,2 |
| 9 | 25,5 |
| 10 | 27,6 |
| 11 | 28,8 |
| 12 | 27,9 |
| 13 | 28,6 |
| 14 | 29,4 |
| 15 | 29,1 |
| 16 | 29,1 |
| 17 | 28,3 |
| 18 | 27,9 |
| 19 | 26,6 |
| 20 | 24,9 |
| 21 | 22,8 |
| 22 | 21,8 |
| 23 | 20,9 |
| 24 | 16,8 |
| 1 | 17,5 |
| 2 | 17,1 |
| 3 | 15,8 |
| 4 | 15,1 |
| 5 | 14,6 |

Technische Zeichnungen

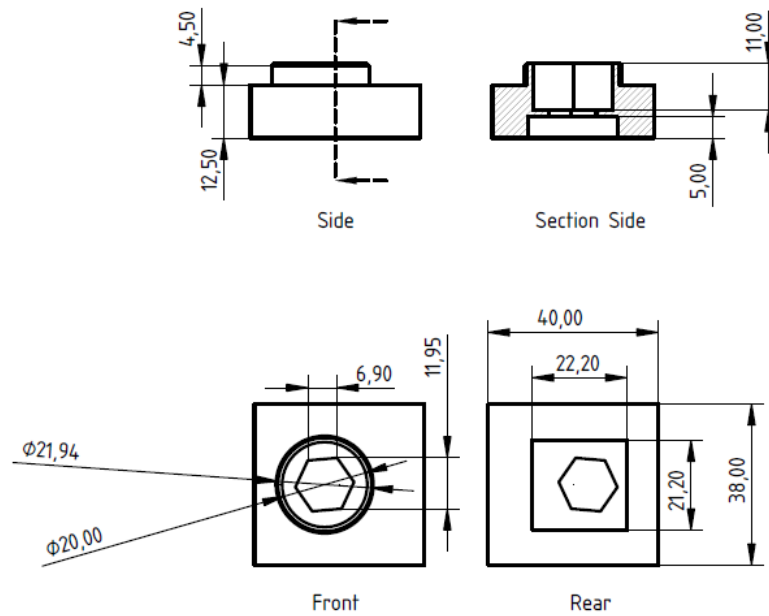


Abb. A 1 Technische Zeichnung der Sensorhalterung des Spektrometers zur Messung der einfallenden Photonendichte. Abmessungen in mm.

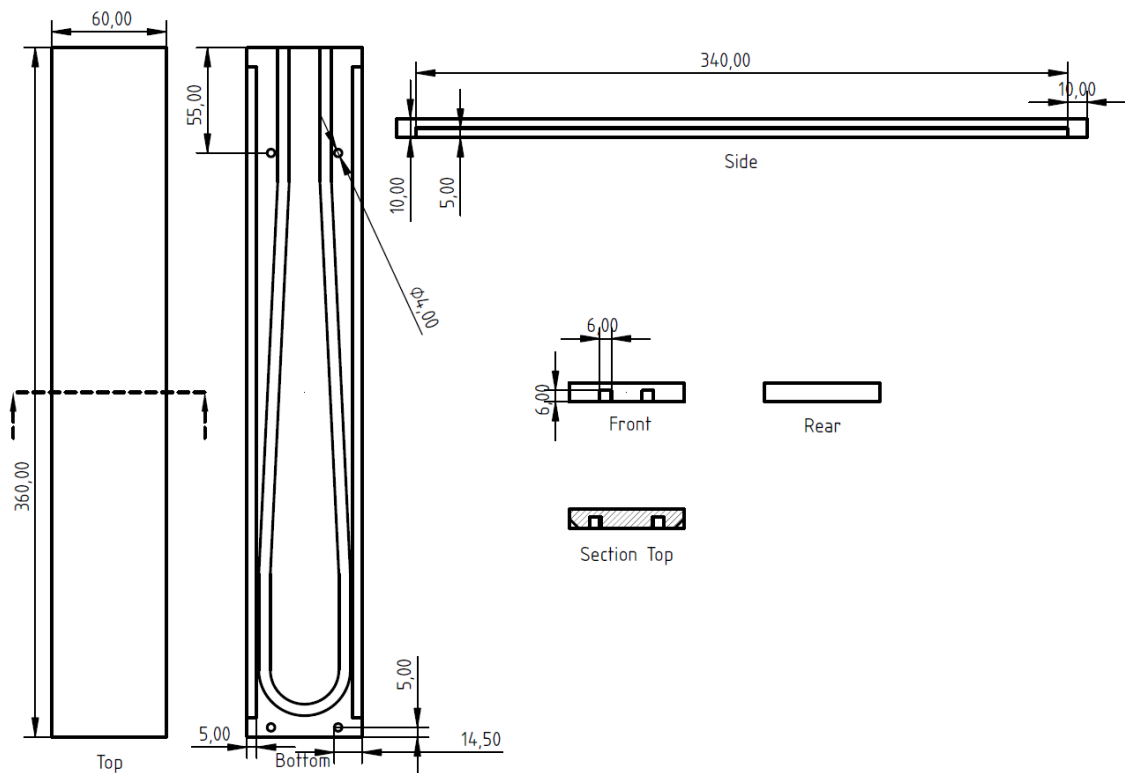


Abb. A 2 Technische Zeichnung des Wärmetauschers. Abmessungen in mm.

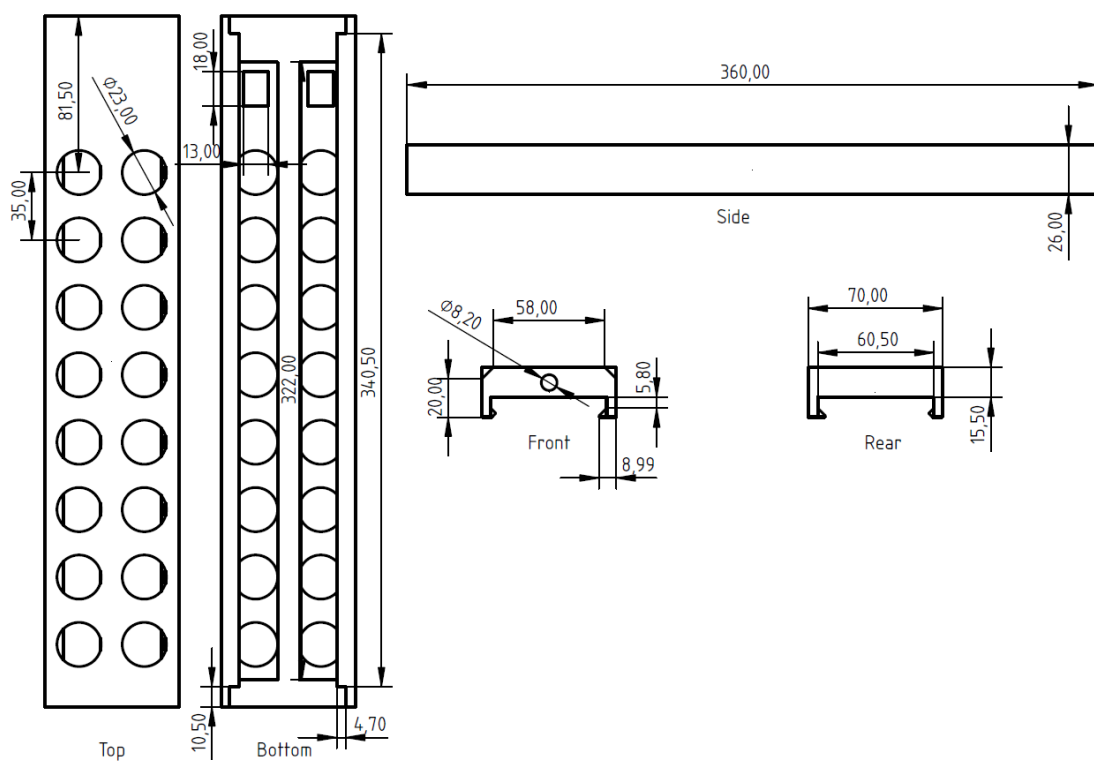


Abb. A 3 Technische Zeichnung des Gehäuses des Beleuchtungsmoduls. Abmessungen in mm.

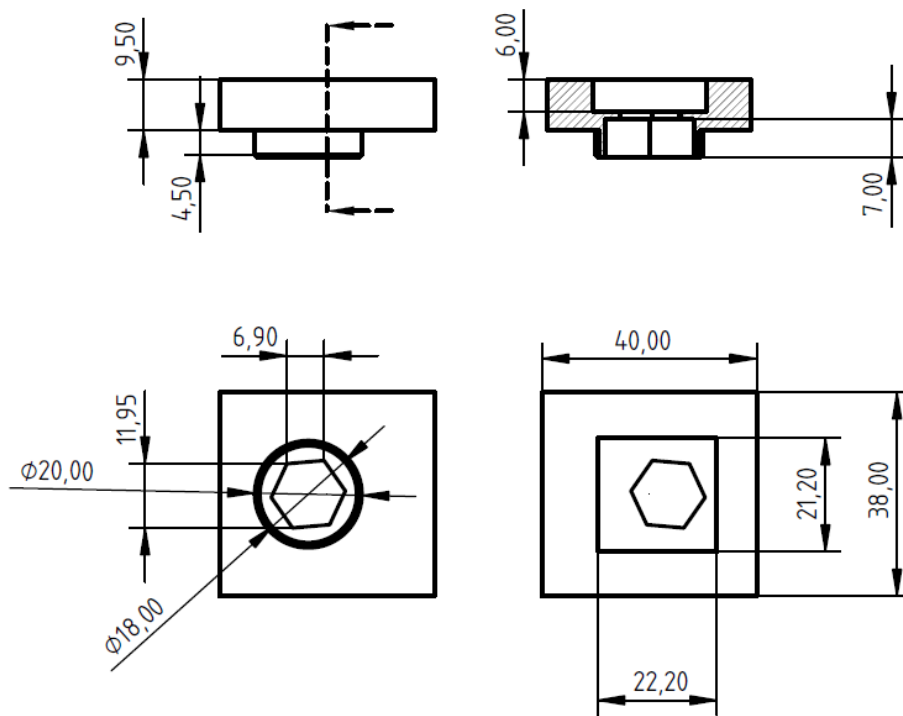


Abb. A 4 Technische Zeichnung der Sensorhalterung des Spektrometers zur Messung der Transmission durch einen miniaturisierten Rührkessel-PBR. Abmessungen in mm.

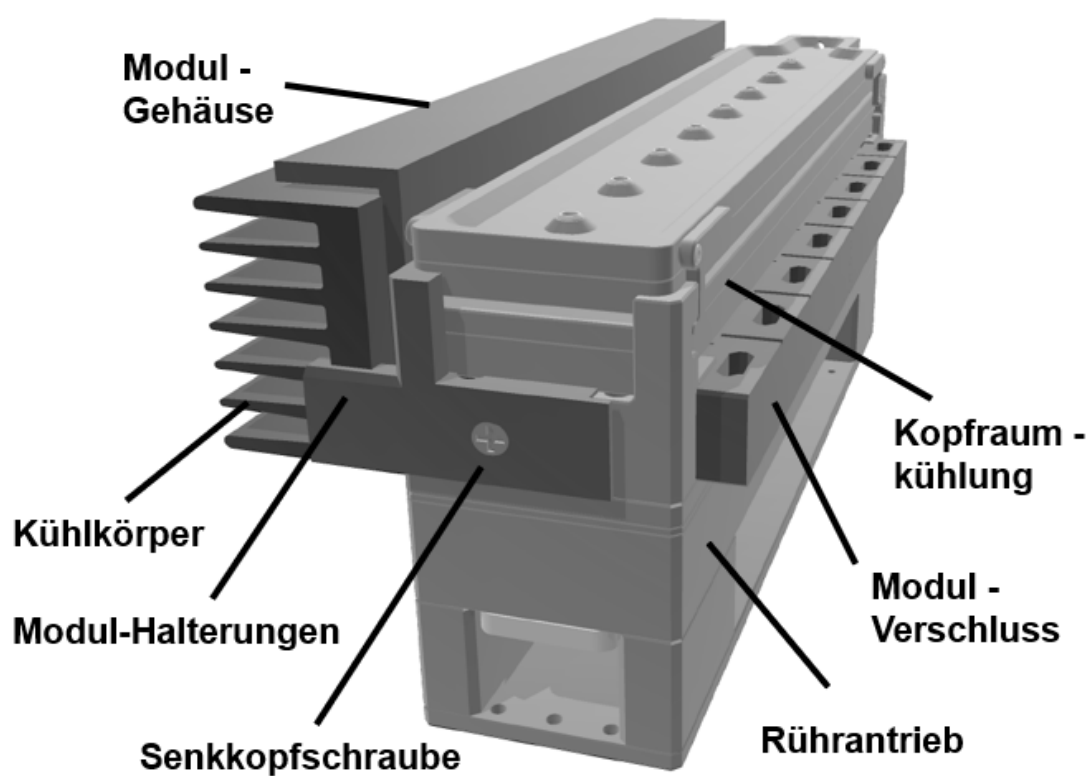


Abb. A 5 Darstellung einer 8-fach parallel Bioreaktoreinheit (bioREACTOR8, 2mag AG, München, Deutschland) mit seitlich angebrachten, luftgekühlten Beleuchtungsmodul.