

**Physiologische Untersuchungen parameterinduzierter
Adaptionsantworten von *Nannochloropsis salina* in
turbidostatischen Prozessen und deren biotechnologischer
Potentiale**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Maren Hoffmann

Kiel, März 2010

Referent: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Korreferent: Prof. Dr. Franciscus Colijn

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2010

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 15.04.2010

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Meiner Familie

„Meter für Meter“

K.W.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Biologische und physiologische Hintergründe	2
1.1.1.	<i>Nannochloropsis</i>	2
1.1.2.	Nitratassimilation	4
1.1.3.	Phosphatassimilation	7
1.1.4.	Fettsäuren und Lipide	8
1.1.5.	Pigmente	9
1.1.6.	Tocopherol	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1.	Kultivierung von <i>Nannochloropsis salina</i>	16
2.1.1.	Diskontinuierliche Kultivierung in einer „batch“-Kultur	16
2.1.2.	Kontinuierliche Kultivierung im Photobioreaktor	17
2.1.2.1.	Aufbau des Photobioreaktors	17
2.1.2.2.	Kultivierungsparameter für den turbidostatischen Prozess	19
2.2.	Konzeption der Experimente	20
2.3.	Bestimmung physiologischer Parameter	21
2.3.1.	Fluoreszenzmessungen	21
2.3.1.1.	<i>Online</i> -Messungen mit dem Mini-PAM	22
2.3.1.2.	<i>Inline</i> -Messungen	22
2.3.2.	Bestimmung der optische Dichte (OD)	23
2.3.3.	Bestimmung der biologischen Trockenmasse (BTM)	23
2.3.4.	Bestimmung der Wachstumsrate (μ)	23

2.3.5.	Bestimmung der Fettsäurekonzentration und des Fettsäuremusters	24
2.3.6.	Bestimmung der Pigmentkonzentration	25
2.3.7.	Bestimmung der α - Tocopherolkonzentration (Vitamin E)	26
2.4.	Bestimmung physiologisch relevanter Nährstoffe	27
2.4.1.	Bestimmung der Kohlen- und Stickstoffkonzentration in der Zelle	27
2.4.2.	Bestimmung der Nitratkonzentration im Medium (DIN/ DON)	27
2.4.3.	Bestimmung der Phosphatkonzentration im Medium (DIP/DOP)	28
2.4.4.	Bestimmung der totalen partikulären Phosphatkonzentration in der Zelle (TPPO ₄ ³⁻)	29
2.5.	Bestimmung der Produktivität von Gesamtfettsäuren (TFA) und Eicosapentaensäure (EPA)	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1.	Ergebnisse der Kultivierungen von <i>Nannochloropsis salina</i> bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen in den Reservoirren	30
3.1.1.	Fluoreszenzmessungen	30
3.1.1.1.	<i>Online</i> -Fluoreszenzsignale	32
3.1.1.2.	<i>Inline</i> -Fluoreszenzsignale	36
3.1.2.	Biologische Trockenmasse (BTM)	41
3.1.3.	Wachstumsrate (μ)	43
3.1.4.	Pigmente	46
3.1.4.1.	Chlorophyll _a (Chl _a)	46
3.1.4.2.	Violaxanthin (Vx)	48
3.1.4.3.	Vaucherixanthin (Vaux)	50
3.1.4.4.	β -Karotin	52

3.1.4.5. Zeaxanthin (Zx)	54
3.1.5. α -Tocopherol	56
3.1.6. Fettsäuren (Fatty Acids, FA)	59
3.1.6.1. Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acids, TFA)	59
3.1.6.2. Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3)	61
3.1.6.2.1. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration	62
3.1.6.2.2. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration	64
3.1.7. Nährstoffe	66
3.1.7.1. Intra- und extrazelluläre Stickstoffkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot in den Reservoirren	66
3.1.7.2. Intra- und extrazelluläre Phosphatkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot in den Reservoirren	68
3.1.7.3. Intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Nitrat- und Phosphatangebot in den Reservoirren	70
3.1.7.4. C/N-Bestimmung in Kulturen mit unterschiedlichem Nitrat- und Phosphatangebot in den Reservoirren	72
3.2. Ergebnisse der Kultivierungen von <i>Nannochloropsis salina</i> bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen in den Reservoirren	74
3.2.1. Fluoreszenzmessungen	74
3.2.1.1. <i>Online</i> -Fluoreszenzsignale	75
3.2.1.2. <i>Inline</i> -Fluoreszenzsignale	77
3.2.2. Biologische Trockenmasse (BTM)	80
3.2.3. Wachstumsrate (μ)	82
3.2.4. Pigmente	83
3.2.5. α -Tocopherol	85

3.2.6.	Fettsäuren (Fatty Acids, FA)	87
3.2.6.1.	Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acids, TFA)	87
3.2.6.2.	Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3)	89
3.2.6.2.1.	Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration	89
3.2.6.2.2.	Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration	90
3.2.7.	Nährstoffe	91
3.2.7.1.	Intra- und extrazelluläre Stickstoffkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot in den Reservoirren	91
3.2.7.2.	Intra- und extrazelluläre Phosphatkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot in den Reservoirren	93
3.2.7.3.	Intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration und das C/N- Verhältnis	95
3.3.	Ergebnisse der Kultivierungen von <i>Nannochloropsis salina</i> bei 26 °C mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen in den Reservoirren	97
3.3.1.	Fluoreszenzmessungen	97
3.3.1.1.	<i>Online</i> -Fluoreszenzsignale	97
3.3.1.2.	<i>Inline</i> -Fluoreszenzsignale	99
3.3.2.	Biologische Trockenmasse (BTM)	102
3.3.3.	Wachstumsrate (μ)	103
3.3.4.	Pigmente	105
3.3.5.	Fettsäuren (Fatty Acids, FA)	107
3.3.5.1.	Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acids, TFA)	107
3.3.5.2.	Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3)	109
3.3.5.2.1.	Einfluss von Nitrat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration	109
3.3.5.2.2.	Einfluss von Nitrat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration	110

3.4.	Ergebnisse der Kultivierung von <i>Nannochloropsis salina</i> bei 29 °C	
	im Vollmedium	111
3.5.	Vergleich der experimentellen Endzustände in Relation zu den	
	Kultivierungsbedingungen	113
3.5.1.	Biologische Trockenmasse (BTM) und Wachstumsrate (μ)	113
3.5.2.	Intrazelluläre Nitrat- und Phosphatkonzentrationen	115
3.5.3.	Fettsäuren	116
3.5.4.	Pigmente (Chlorophyll _a ; Chl _a)	122
3.5.5.	α -Tocopherol	123
3.5.6.	<i>On</i> - und <i>inline</i> Fluoreszenz	125
3.5.6.1.	Temperatureinfluss auf <i>on</i> - und <i>inline</i> Fluoreszenz	125
3.5.6.2.	Nitrateinfluss auf <i>on</i> - und <i>inline</i> Fluoreszenz	127
3.5.6.3.	Phosphateinfluss auf <i>on</i> - und <i>inline</i> Fluoreszenz	128
3.5.7.	Produktivität von Gesamtfettsäuren (TFA) und Eicosapentaensäure (EPA)	129
4.	DISKUSSION	131
4.1.	Adaptionsphase	131
4.2.	Biologische Trockenmasse (BTM) & Wachstumsrate (μ)	134
4.3.	Pigmente und Fluoreszenzsignale	137
4.3.1.	Chlorophyll _a und Fluoreszenzsignale bei Nitratmangel	137
4.3.2.	Karotenoide bei Nitratmangel	139
4.3.3.	Pigmente und Fluoreszenzsignale bei Phosphatmangel	141
4.3.4.	Pigmente und Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Temperaturen	143
4.4.	Fettsäuren	144
4.4.1.	Einfluss von Nitrat auf den zellulären Gesamtfettsäuregehalt (TFA)	144

4.4.2.	Einfluss von Nitrat auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)	147
4.4.3.	Einfluss von Phosphat auf Fettsäuregehalt und –muster	148
4.4.4.	Einfluss von Temperatur auf Fettsäuregehalt und –muster	149
4.5.	α-Tocopherol	152
4.6.	Produktivität und bioverfahrenstechnische Aspekte	155
5.	AUSBLICK	157
6.	ZUSAMMENFASSUNG	158
7.	SUMMARY	159
8.	LITERATURVERZEICHNIS	161

GLEICHUNGEN

2. Material und Methoden

(2.1.)	Photochemische Effizienz $\phi_{PSII} = (F_M' - F) / F_M'$ in [r.E.]	22
(2.2.)	Wachstumsrate $\mu = \Delta V_R / (V_L \cdot \Delta t)$ in [d^{-1}]	23
(2.3.)	Produktivität $P = C \cdot \mu$ [$mg L^{-1} d^{-1}$]	29

ABBILDUNGEN

1. Einleitung

1.1. Biologische und physiologische Hintergründe

Abb. 1.1.1.	Nitratassimilation in photosynthetisch aktiven Eukaryoten	5
Abb. 1.1.2.	Übersicht über den Xanthophyllzyklus	12
Abb. 1.1.3.	Beziehungen zwischen dem Xanthophyllzyklus und dem photosynthetischem Elektronentransport in der Thylakoidmembran	13
Abb. 1.1.4.	Strukturen der Tocopherol- und Tocotrienolverbindungen	14

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung von *Nannochloropsis salina*

Abb. 2.1.1.	Technischer Aufbau eines einzelnen Photobioreaktors	18
Abb. 2.1.2.	Lichtprotokoll idealisierter Antworten auf Fluoreszenzsignale	21

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Kultivierungen von *Nannochloropsis salina* bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen in den Reservoiren

Abb. 3.1.1.	Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' (* normiert) und der daraus ermittelten photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} der Referenzkultur	32
Abb. 3.1.2.	Zeitlicher Verlauf des online gemessenen Fluoreszenzsignals F	33
Abb. 3.1.3.	Zeitlicher Verlauf des online gemessenen Fluoreszenzsignals F_M'	34
Abb. 3.1.4.	Zeitlicher Verlauf der photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} , ermittelt aus den online gemessenen Fluoreszenzsignalen F und F_M'	35
Abb. 3.1.5.	Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' und der daraus ermittelten photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} der Referenzkultur	37
Abb. 3.1.6.	Zeitlicher Verlauf des inline gemessenen Fluoreszenzsignals F	38
Abb. 3.1.7.	Zeitlicher Verlauf des inline gemessenen Fluoreszenzsignals F_M'	39
Abb. 3.1.8.	Zeitlicher Verlauf der aus inline-Fluoreszenzsignalen ermittelten photochemischen Effizienz ϕ_{PSII}	40
Abb. 3.1.9.	Zeitlicher Verlauf der Biologischen Trockenmasse (BTM)	42
Abb. 3.1.10.	Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten (μ)	44
Abb. 3.1.11.	Zeitlicher Verlauf der Chl_a-Konzentration $mg [g BTM]^{-1}$	47
Abb. 3.1.12.	Zeitlicher Verlauf der Violaxanthinkonzentration $mg [g BTM]^{-1}$	49
Abb. 3.1.13.	Zeitlicher Verlauf von Vaucherixanthin Area [g^{-1}]	51
Abb. 3.1.14.	Zeitlicher Verlauf der β -Karotinkonzentration $mg [g BTM]^{-1}$	53
Abb. 3.1.15.	Zeitlicher Verlauf der Zeaxanthinkonzentration $mg [g BTM]^{-1}$	55
Abb. 3.1.16.	Zeitlicher Verlauf der α -Tocopherolkonzentrationen	57
Abb. 3.1.17.	Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM]	60
Abb. 3.1.18.	Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) [% w/w BTM]	63
Abb. 3.1.19.	Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils von Eicosapentaensäure (EPA) am Gesamtsäurefettgehalt (TFA) [% w/w TFA]	65
Abb. 3.1.20.	Zeitliche Verläufe der intrazellulären und extrazellulären Stickstoffkonzentration	67

Abb. 3.1.21. Zeitliche Verläufe der intrazellulären und extrazellulären Phosphatkonzentration	69
Abb. 3.1.22. Zeitliche Verläufe der intrazellulären Kohlenstoffkonzentration	71
Abb. 3.1.23. Zeitliche Verläufe des C/N-Verhältnisses	73

3.2. Ergebnisse der Kultivierungen von *Nannochloropsis salina* bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen in den Reservoiren

Abb. 3.2.1. Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) von <i>N. salina</i> unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C (* normiert)	76
Abb. 3.2.2. Zeitlicher Verlauf der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} von <i>N. salina</i> unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	77
Abb. 3.2.3. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) (* normiert)	78
Abb. 3.2.4. Zeitlicher Verlauf der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} , ermittelt aus den inline gemessenen Fluoreszenzsignalen F und F_M'	80
Abb. 3.2.5. Zeitlicher Verlauf der Biologischen Trockenmasse (BTM) [$g L^{-1}$] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	81
Abb. 3.2.6. Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten μ [d^{-1}] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	82
Abb. 3.2.7. Zeitliche Verläufe unterschiedlicher Pigmente von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	84
Abb. 3.2.8. Zeitlicher Verlauf der α -Tocopherolkonzentrationen [$\mu g g^{-1}$] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	86
Abb. 3.2.9. Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	88
Abb. 3.2.10. Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	90
Abb. 3.2.11. Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w TFA] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C	91
Abb. 3.2.12. (A) Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Stickstoffkonzentration C_{Nintra} und (B) Zeitlicher Verlauf der extrazellulären Stickstoffkonzentration C_{Nextra}	92
Abb. 3.2.13. (A) Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Phosphatkonzentration C_{Pintra} und (B) Zeitlicher Verlauf der extrazellulären Phosphatkonzentration C_{Pextra}	94
Abb. 3.2.14. (A) Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Kohlenstoffkonzentration C_{Cintra} in $mg [g BTM]^{-1}$ und (B) das C/N- Verhältnis [-]	96

3.3. Ergebnisse der Kultivierungen von *Nannochloropsis salina* bei 26 °C mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen in den Reservoiren

Abb. 3.3.1. Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) und die daraus berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} (C)	98
Abb. 3.3.2. Zeitlicher Verlauf der Inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' (* normiert) der Referenzkultur (REF) und der daraus ermittelten photochemischen Effizienz ϕ_{PSII}	99
Abb. 3.3.3. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F^* (A) und $F_M'^*$ (B) (*normiert) und die daraus berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} (C)	100
Abb. 3.3.4. Zeitlicher Verlauf der Biologischen Trockenmasse (BTM) von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	102
Abb. 3.3.5. Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten [d^{-1}] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	104
Abb. 3.3.6. Zeitlicher Verlauf der Chlorophyll a - (A), Violaxanthin- (B) und β -Karatinkonzentration (C) in $mg [g BTM]^{-1}$ von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	106
Abb. 3.3.7. Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	108

Abb. 3.3.8.	Zeitlicher Verlauf der der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	109
Abb. 3.3.9.	Zeitlicher Verlauf der der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w TFA] von <i>N. salina</i> Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C	110
3.5. Vergleich der experimentellen Endzustände in Relation zu den Kultivierungsbedingungen		
Abb. 3.5.1.	Einfluss der Temperatur auf die Wachstumsraten μ [d^{-1}] von Kulturen (●) ohne Nitratlimit. REF, (○) mit Nitratlimit. N_{75} und (□) mit Phosphatlimit.	113
Abb. 3.5.2.	Einfluss der (A) Nitratkonzentration bei (○) 21 °C und (●) 26 °C und Einfluss der (B) Phosphatkonzentration bei (○) 21 °C auf die Wachstumsraten μ [d^{-1}]	114
Abb. 3.5.3.	Intrazelluläre (A) Stickstoffkonzentration und (B) Phosphatkonzentration in <i>N. salina</i> Kulturen bei 17 °C und 21 °C	115
Abb. 3.5.4.	Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der Gesamtfettsäure TFA [% BTM] und Eicosapentaensäure EPA [% BTM] von Kulturen (A) ohne Nitratlimit. REF und (B) mit Nitratlimit. N_{75}	116
Abb. 3.5.5.	Einfluss der Temperatur auf die Konzentration von Eicosapentaensäure EPA [% TFA] von Kulturen (●) ohne Nitratlimit. REF und mit (○) Nitratlimit. N_{75}	117
Abb. 3.5.6.	Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der mehrfach ungesättigte Fettsäuren PUFA [% BTM] von Kulturen (●) ohne Nitratlimit. REF und (○) mit Nitratlimit. N_{75}	118
Abb. 3.5.7.	Einfluss von Nitratlimitierung (N_{75}) und Phosphatlimitierung (P_6) auf die Konzentration der PUFA [% BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen bei (●) 21 °C und (○) 17 °C	118
Abb. 3.5.8.	Einfluss der Temperatur auf den Anteil von EPA an PUFA und die Summe des Anteils anderer ungesättigter Fettsäuren excl. EPA (PUFA*) an PUFA (A) in der Referenzkultur und (B) in einer nitratlimitierten Kultur	120
Abb. 3.5.9.	Einfluss der (A) Nitrat- und (B) der Phosphatkonzentration auf die Konzentration der Gesamtfettsäuren TFA [% BTM] und der Eicosapentaensäure EPA [% BTM] in <i>N. salina</i> -Experimenten bei 21 °C	121
Abb. 3.5.10.	Einfluss von Nitratlimitierung (N_{75}) und Phosphatlimit. (P_6) auf die Konzentration der Gesamtfettsäuren TFA [% BTM] und der Eicosapentaensäure EPA [% BTM] von <i>N. salina</i> Kulturen bei 17 °C	121
Abb. 3.5.11.	Einfluss der Temperatur auf die Chlorophyll _a -Konzentration von Kulturen (●) ohne Nitratlimit. REF, (○) mit Nitratlimit. N_{75} und (□) mit Phosphatlimit.	122
Abb. 3.5.12.	Einfluss der (A) Nitratkonzentration bei (●) 21 °C bei (○) 26 °C und der (B) Phosphatkonzentration bei (○) 21 °C auf die Chlorophyll _a -Konzentration	123
Abb. 3.5.13.	Einfluss von Nitratlimitierung (N_{75}) und Phosphatlimitierung (P_6) auf die α -Tocopherolkonzentration in <i>N. salina</i> -Experimenten bei (●) 21 °C und (○) 17 °C	124
Abb. 3.5.14.	Einfluss der (A) Nitrat- und der (B) Phosphatkonzentration bei 21 °C auf die α -Tocopherolkonzentration	124
Abb. 3.5.15.	Einfluss der Temperatur auf die (A) inline und (B) online Fluoreszenzsignale F und auf die (C) inline und (D) online ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII}	126
Abb. 3.5.16.	Einfluss unterschiedlicher Nitratangebote auf die (A) inline und (B) online gemessenen Fluoreszenzsignale F und auf die (C) inline und (D) online ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII}	127
Abb. 3.5.17.	Einfluss unterschiedlicher Phosphatangebote auf die (A) inline und (B) online gemessenen Fluoreszenzsignale F und auf die (C) inline und (D) online ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII}	128
Abb. 3.5.18.	Überblick der TFA-Produktivitäten [$mg L^{-1} d^{-1}$] aller Experimente mit verschiedenen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium in Kombination mit verschiedenen Temperaturen	129
Abb. 3.5.19.	Überblick der EPA-Produktivitäten [$mg L^{-1} d^{-1}$] aller Experimente mit verschiedenen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium in Kombination mit verschiedenen Temperaturen	130

TABELLEN

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung von *Nannochloropsis salina*

Tab. 2.1.1. *F/2- Medium nach Guillard & Ryther (1962)* 16

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen im Medium

Tab. 3.1.1. *Startwerte mit Standardabweichung der online gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M'* 31

Tab. 3.1.2. *Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale* 31

Tab. 3.1.3. *Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte ($3 d^{-1}$) und Standardabweichungen der biologischen Trockenmasse (BTM)* 43

Tab. 3.1.4. *Wachstumsraten von *N. salina* Kulturen* 46

Tab. 3.1.5. *Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucherixanthin (Vaux), β -Karotin (β -Kar) und Zeaxanthin (Zx)* 56

Tab. 3.1.6. *Stationäre Werte von α -Tocopherol der Experimente bei 21 °C* 58

Tab. 3.1.7. *Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonzentration (EPA)* 61

3.2. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen im Medium

Tab. 3.2.1. *Startwerte der online gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M'* 74

Tab. 3.2.2. *Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M'* 75

Tab. 3.2.3. *Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte ($3 d^{-1}$) und Standardabweichungen der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C* 81

Tab. 3.2.4. *Wachstumsraten von *N. salina* Kulturen nach 350 h unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C mit unterschiedl. Nitrat- und Phosphatangeboten* 83

Tab. 3.2.5. *Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucherixanthin (Vaux), β -Karotin (β -Kar) und Zeaxanthin (Zx)* 85

Tab. 3.2.6. *Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) nach 350 h der Experimente bei 17 °C* 88

3.3. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 26 °C mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen im Medium

Tab. 3.3.1. *Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' zu Beginn des turbidostatischen Prozesses (*normiert siehe Text)* 101

Tab. 3.3.2. *Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte ($3 d^{-1}$) und Standardabweichungen der Biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C* 103

Tab. 3.3.3. *Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx) und β -Karotin (β -Kar) der Experimente bei 26 °C* 107

Tab. 3.3.4. *Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonz. (EPA) nach 350 h der Experimente bei 26 °C und unterschiedl. Nitratangeboten* 108

3.4. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 29 °C im Vollmedium

Tab. 3.4.1. *Zusammenfassung von Werten unterschiedlicher physiologischer Parameter von *N. salina*, kultiviert im Vollmedium bei 29 °C* 112

3.5. Vergleich der experimentellen Endzustände in Relation mit den Kultivierungsbedingungen	
Tab. 3.5.1. <i>Werte der gesättigten Fettsäuren (S), einfach ungesättigten Fettsäuren (M) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) nach 350 h der Experimente bei 21 °C, 17 °C und 26 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten</i>	119
4. Diskussion	
Tab. 4.1. <i>Überblick über parameterinduzierte Effekte auf N. salina während turbidostatischer Prozesse</i>	132
Tab. 4.2. <i>Überblick über Parameterkombinationen und dessen bestimmender Stressor in N. salina während turbidostatischer Prozesse</i>	132

ABKÜRZUNGEN

μ	Wachstumsrate
$^1\text{Chl}^*$	Chlorophyll im Singulettzustand
$^1\text{O}_2^*$	Singulett-Sauerstoff
$^3\text{Chl}^*$	Chlorophyll im Triplettzustand
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biologische Trockenmasse
Chl_ <i>a</i>	Chlorophyll_ <i>a</i>
EPA	eicosapentaenoic acid (Eicosapentaensäure; C20:5 ω 3)
ETC	electron transport chain (Elektronen-Transport-Kette)
F	aktuelle minimale Fluoreszenz einer lichtadaptierten Probe
F_M'	maximale Fluoreszenz einer lichtadaptierten Probe
LED	light emitting diode (Leuchtdiode)
LHC I/ II	light harvesting complex (Komplex der Lichtsammelpigmente des Photosystems I/ II)
MUFA	monounsaturated fatty acid (einfach ungesättigte Fettsäure)
NADPH(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
OD	optische Dichte
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	photosynthetically active radiation (photosynthetisch wirksames Licht); 400-700 nm
P_i	anorganisches Phosphat
PS I/ II	Photosystem I/ II
PUFA	polyunsaturated fatty acid (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
r.E.	relative Einheiten
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoff-Spezies)
S+M	Summe aus gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren
SAFA	saturated fatty acid (gesättigte Fettsäure)
SAG	Sammlung von Algenkulturen Göttingen
UV-C	kurzwelligste Bereich des ultravioletten Lichtes (100 - 280 nm)
Vaux	Vaucherixanthin
VAZ	Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin-Zyklus
Vx	Violaxanthin
Zx	Zeaxanthin
β -Kar	β -Karotin
Φ_{PSII}	photosynthetische Effizienz des Photosystems II
λ	Wellenlänge [nm]

1. EINLEITUNG

Mikroalgen repräsentieren eine extrem diverse, aber dennoch hoch spezialisierte Gruppe photosynthetisch aktiver Organismen. Sie sind in verschiedenartigen ökologischen Habitaten wie z.B. Süß- und Brackwasser, sowie in marinen und hypersalinen Gewässern beheimatet und haben sich an Temperatur- und pH-Schwankungen sowie einzigartigen Nährstoffverfügbarkeiten angepasst (Falkowski & Raven 1997). Bis jetzt sind über 40.000 Mikroalgenspezies identifiziert worden (Hu et al. 2008) und Tausende dieser Spezies und Stämme werden zurzeit weltweit in Kultursammlungen gehalten (z.B. <http://epsag.uni-goettingen.de>; <http://www.marine.csiro.au/microalgae>; <http://wdec.nig.ac.jp/hpcc.html>).

Das große Potential phototropher Mikroorganismen als alternative Rohstofflieferanten für beispielsweise Biodiesel, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs), Vitaminen, Toxinen oder Antibiotika macht sie zu attraktiven Kandidaten für Pharmazie, Kosmetik, Aquakultur oder Quellen erneuerbarer Energien (Sheehan et al. 1998; Durmaz 2007; Gouveia et al. 2008; Rodolfi et al. 2009; Srinivasakumar & Rajashekhar 2009).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Fettsäureproduktion in der Mikroalge *Nannochloropsis salina* dar. Zusammen mit den Mikroalgen *Tetraselmis* und *Isochrysis* ist sie eine vornehmliche Quelle von essentiellen Fettsäuren in der Aquakultur (Abu-Rezq et al. 1999; Milione et al. 2007; Ferreira et al. 2009). Diese gewährleisten z.B. die Fruchtbarkeit und das Wachstum von Zooplankton, welches wiederum in vielen Aufzuchtstationen für den Transfer von essentiellen Fettsäuren in die Fischlarven eingesetzt wird (James & Abu-Rezq 1988; Korstad et al. 1995; Zhen et al. 2010). Aber auch der Mensch ist nicht zur de novo-Synthese der Stammverbindungen der ω 6- sowie der ω 3-Fettsäurefamilien (Linolsäure, α -Linolensäure) befähigt, so dass diese Verbindungen mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (Dähler & Saner 2007).

Die zurzeit am häufigsten konsumierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA's) stammen aus Pflanzenölen und gehören zur Gruppe der ω 6-Fettsäuren (Sijtsma & de Swaaf 2004) und die zurzeit einzige kommerzielle Quelle für ω 3-Fettsäuren ist marines Fischöl (Xu et al. 2004). Die am häufigsten genutzten Quellen für ω 3-PUFAs, inklusive Docosahexansäure (docosahexaenoic acid, DHA) und Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid, EPA) stammen von fettreichen Fischarten wie Hering, Makrele, Sardinen und Lachs (Gunstone & Harwood 2006). Die Anwendung von PUFA's aus Fischölen in Lebensmitteln (z.B. Anreicherung von Kindernahrung) oder für pharmazeutische Anwendungen hat aber einige Nachteile. Diese ergeben sich durch die Kontamination der

Fischöle durch Umweltverschmutzungen, aufgrund des typischen Fischgeruchs sowie unangenehmen Geschmacks (Sijtsma & de Swaaf 2004). Darüber hinaus ist marines Fischöl eine komplexe Mischung aus Fettsäuren verschiedener Längen und unterschiedlicher Anzahl ungesättigter Bindungen, aufgrund dessen die Aufreinigung sehr kostenintensiv ist (Sijtsma & de Swaaf 2004).

Das z.B. aus ernährungsphysiologischer Sicht wichtige Gleichgewicht zwischen ω -3- und ω -6-Fettsäuren (Adam 1994; Dähler & Saner 2007), abnehmende Fischbestände und aufwendige Extraktionsverfahren von ω 3-Fettsäuren aus Fischen (Sijtsma & de Swaaf 2004) zeigen die Vorteile, Mikroalgen als alternative Quelle von essentiellen ω 3-Fettsäuren stärker zu etablieren.

Doch auch das Potential von Mikroalgen, große Mengen an neutralen Lipiden zu produzieren (Hu et al. 2008), hat aufgrund der in den letzten Jahren rapide zunehmenden Ölpreise, weltweit zurückgehenden Ölreserven und der Zerstörung der Umwelt, die mit der Nutzung fossiler Brennstoffe eng verbunden ist, ein erneutes Interesse geweckt, Algen als einen alternativen Rohstoff für die Kraftstoffproduktion zu nutzen.

Der erster Schritt jedoch, um Mikroalgen im Großmaßstab einsetzen zu können, beginnt mit der Auswahl geeigneter Mikroalgenspezies (Griffith et al. 2009). Eine erfolgreiche Mikroalgenbiotechnologie ist hauptsächlich abhängig von der Wahl der richtigen Mikroalge mit zellspezifischen Eigenschaften, welche interessant für biotechnologische und demnach kommerzielle Prozesse sind (Pulz & Gross 2004).

Darüber hinaus ist es notwendig, eine Prozessstrategie für die Mikroalgenbiotechnologie zu entwickeln, um so die optimalen Faktoren für Biomasse- und/oder Metaboliten-Produktion festlegen zu können. Dabei ist es zunächst entscheidend, die Prozesse unter definierten Bedingungen durchzuführen. Demzufolge können dann die Einflüsse unterschiedlicher Kultivierungsparameter, die diese auf das Zellwachstum und den Metabolismus der phototrophen Mikroorganismen haben, konkret dargestellt werden.

Die Wahl der Mikroalge für diese Studie fiel auf *Nannochloropsis salina* und ist begründet durch ihre Eigenschaft, den Fettgehalt in hohem Maße variieren zu können (Sukenik 1993a; 1993b). Unter Berücksichtigung der. o.g. Aspekte bietet sich die turbidostatische Prozessführung an (Lippemeier et al. 2001; Marxen et al. 2005), die in folgender Arbeit eingesetzt wurde. Das Ziel dieser Arbeit ist

- die Einflüsse unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatverfügbarkeiten sowie den Einfluss der Temperatur auf verschiedene physiologische Parameter in einem turbidostatisch betriebenen Photobioreaktor herauszuarbeiten,

- die Produktivitäten bezüglich des Gesamtfettsäuregehalts (total fatty acids, TFA) und der ω 3-Fettsäure Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid, EPA) aus den Ergebnissen der physiologischen Untersuchungen zu bestimmen.

1.1. Biologische und physiologische Hintergründe

1.1.1. *Nannochloropsis*

Mitglieder der Gattung *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*) sind im Plankton von marinen Ökosystemen und besonders im Küstenwasser weit verbreitet. Bis jetzt sind fünf verschiedene Spezies in salinen Habitaten – *N. salina*, *N. granulata*, *N. oculata*, *N. oceanica* und *N. gaditana* (Hibberd 1981; Karlson et al. 1996; Suda et al. 2002) - und eine Spezies im Frischwasserhabitat – *N. limnetica* (Krienitz et al. 2000) - beschrieben worden. Mit ihrer Größe von 2–5 μ m gehören sie zum picoeukaryotischen Plankton (Hu & Gao 2003), welches mit einer Konzentration zwischen 10^2 und 10^4 Zellen pro cm^3 überall in den euphotischen Zonen der Weltmeere zu finden ist (Caron et al. 1999). Weiterhin sind sie, aufgrund ihres Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, metabolisch sehr aktive Mikroorganismen (Moreno-Garrido et al. 1998).

Mitglieder der Gattung *Nannochloropsis* sind durch das Fehlen von Chlorophyll *b*, welches ein generelles Phänomen in der Klasse der *Eustigmatophyceae* ist, und durch die Zusammensetzung der Xanthophylle charakterisiert (Whittle & Casselton 1975; Volkman et al. 1993; Lubián et al. 2000). Das Karotenoidmuster von *Nannochloropsis*, mit den wichtigsten Xanthophyllen β -Karotin, Violaxanthin und Vaucheriaxanthinester, ist relativ übersichtlich (Antia & Cheng 1982; Karlson et al. 1996). Zeaxanthin und Antheraxanthin können in geringeren Konzentrationen in stark belichteten Kulturen detektiert werden (Sukenik 1999).

Charakteristisch für die Mikroalge *Nannochloropsis* ist die Zusammensetzung der Fettsäuren. Hierbei nimmt die omega-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3) eine zentrale Stellung ein. Diese kann, im Vergleich zu den meisten anderen Mikroalgen, in einer deutlich höheren Konzentration von *Nannochloropsis* synthetisiert werden. Als weitere wichtige Komponente unter den Fettsäuren tritt auch die omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (ARA, C20:4 ω 6) auf.

Weiterhin ist die Mikroalge *Nannochloropsis* in der Lage, ihren Lipidgehalt stark zu variieren. Dabei spielen die Triacylglycerole (TAG), die so genannten Speicherlipide, eine

bedeutende Rolle. Diese sind durch einen hohen Anteil der kurzkettig gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acid, SAFA) C14:0 und C16:0 und den einfach ungesättigten Fettsäuren (monounsaturated fatty acid, MUFA) C14:1 und C16:1 gekennzeichnet (Maruyama et al. 1986; Sukenik et al. 1993b; Schneider & Roessler 1995).

Für die Aquakultur ist die Mikroalge *Nannochloropsis*, aufgrund der hohen Qualität der Biomasse, schon seit vielen Jahren von großer Bedeutung (Watanabe 1993; Sukenik et al. 1993b; Chini-Zittelli et al. 1999; Ferreira et al. 2009). Begründet ist dieser Status durch die hohe Konzentration von zellulärem EPA in dieser Mikroalge.

1.1.2. Nitratassimilation

Die Nitrataufnahme und der Einbau von Stickstoff in zelleigene Substanzen zählen, aufgrund der experimentellen Auslegung, in dieser Arbeit zu einer der zentralen Themen. Deshalb soll hier eine kurze Übersicht über die Nitrat-Assimilation gegeben werden.

Nitrat ist neben Ammonium die primäre Stickstoffquelle für viele Organismen. Obwohl die Assimilation von Ammonium einen geringeren Energieaufwand als die von Nitrat benötigt (Bloom et al. 1992), und viele Spezies Ammonium bevorzugen, ist Nitrat, aufgrund seines höheren Vorkommens, die bevorzugte Stickstoffquelle (Fernandez & Galvan 2008).

Die Nitratassimilation scheint ein „einfacher“ Prozess in photosynthetisch aktiven Eukaryoten zu sein. In diesen Prozess sind zwei Transport- und zwei Reduktionsschritte involviert, um Ammonium im Chloroplasten zu produzieren. Dort findet auch hauptsächlich die Inkorporation von Ammonium durch den Glutamat-Synthase/ Glutamin-Synthetase Weg (GOGAT/ GS Weg) in das Kohlenstoffgerüst statt (Crawford 1995). Mit ihm beginnt die für die Biosynthese von Aminosäuren entscheidende Aminierung und ist Ausgangspunkt für die Synthese weiterer N-haltiger Verbindungen, wie Nukleinsäuren, Chlorophylle und vieler anderer Biomoleküle. Die dafür notwendige Energie wird in Form von ATP und Reduktionsequivalenten, wie z.B. NAD[P]H und Ferredoxin, bereitgestellt (Richter 1996). Eine Bilanzierung des Elektronen- und ATP-Verbrauchs ergibt für den Einbau eines Nitrations in das Glutamin netto 6 ATP, 10 Elektronen und 8 Protonen (Bendixen 1998).

Die Transportschritte bestehen aus dem Weg von Nitrat in die Zelle und von Nitrit in den Chloroplasten (*Abb. 1.1.1.*). Der Transfer durch die Plasmamembran wird durch einen elektrogenen sekundär-aktiven H^+/NO_3^- Symport gewährleistet (Glass & Siddiqui 1995). Bei einem Symport handelt es sich um einen gleichzeitigen Transport von zwei Substanzen in die

gleiche Richtung und wird hier elektrogen bezeichnet, weil gleichzeitig eine Netto-Ladung bewegt wird. Bei einem sekundär aktiven Transport ist die einzige Triebkraft ein elektrochemisches Potential über eine Membran, welches durch einen primär-aktiven Transport gebildeten Protonengradienten entsteht (Richter 1996).

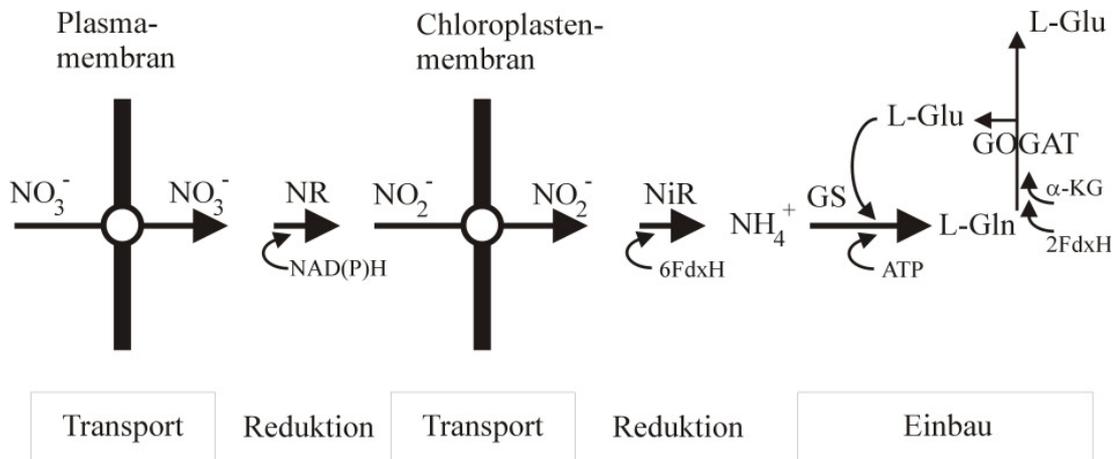


Abb. 1.1.1. Nitrataassimilation in photosynthetisch aktiven Eukaryoten (aus Fernandez & Galvan 2008): NR, Nitrat-Reduktase; NiR, Nitrit-Reduktase; GS, Glutamin-Synthetase; GOGAT, Glutamin-Oxoglutarat-Amidtransferase oder Glutamat-Synthase; FdxH, reduziertes Ferredoxin; Glu, Glutamat; Gln, Glutamin; α -KG, α -Ketoglutarat

Der erste Reduktionsschritt von Nitrat zu Nitrit erfolgt im Cytosol und wird durch die Nitratreduktase (NR) katalysiert, während die Nitritreduktase (NiR) für den zweiten Reduktionsschritt, von Nitrit zu Ammonium, im Chloroplasten verantwortlich ist (Galvan & Fernandez 2001).

NR und NiR sind hoch konservierte Sequenzen in Algen und Höheren Pflanzen (Caboche & Rouze 1990; Crawford & Forde 2002; Wray & Kinghorn 1989). Das Schlüsselenzym für die Nitrataassimilation jedoch ist die NR (Appenroth & Lillo 2003). Dieses ist ein, im Cytoplasma vorliegendes, Homodimer mit jeweils drei prosthetischen Gruppen: FAD (Flavinadenindinukleotid), Häm b_{557} und einem Molybdän, das Bestandteil eines Kofaktors ist (Fernandez & Galvan 2008). Über diese drei Redox-Domänen werden Elektronen von NADH auf Nitrat übertragen, das zu Nitrit reduziert wird (Appenroth & Lillo 2003). Gleichzeitig wird der Cofaktor NADH, der aus der Respiration oder Photosynthese stammt, zu NAD oxidiert.

Für den Transport von Nitrat und Nitrit sind verschiedene Proteinfamilien verantwortlich. Aus dem Genom von *Chlamydomonas* beispielsweise wurden für diese Funktion die Proteinfamilien NRT1, NRT2 und NAR1 abgeleitet (Fernandez & Galvan 2007).

Einige NRT2-Proteine benötigen zur Sicherstellung ihrer Funktion zusätzlich das NAR2-Protein. Die Notwendigkeit des NAR2-Proteins wurde aber nicht nur in *Chlamydomonas* (Zhou et al. 2000), sondern auch in anderen Systemen wie Moosen (Tsujiimoto et al. 2007) und Pflanzen bestätigt (Tong et al. 2005; Okamoto et al. 2006; Orsel et al. 2006). Der Nachweis für die Funktionalität der Transporter gelang in *Chlamydomonas* jedoch nur für den hoch affinen Nitrat/Nitrit-Transporter HANNiT (NRT2.1/NAR2), für den Nitrat-Transporter HANT (NRT2.2/NAR2), welcher eine geringere Affinität und Kapazität für Nitrat als HANNiT zeigt und für einen hoch affinen Nitrit-Transporter (NRT2.3) (Quesada et al. 1994; Fernandez & Galvan 2007).

Weil die Nitratassimilation sehr energieaufwendig und das Reaktionsprodukt Nitrit ein Zellgift ist, wird die NR hochgradig reguliert (Crawford & Forde 2002; Appenroth & Lillo 2003). Durch verschiedene Methoden konnte von den Autoren gezeigt werden, dass Nitrat durch einen noch unbekanntem Mechanismus die Transkription des NR-Gens stimuliert. Auch auf die Genexpression anderer Enzyme der Nitratassimilation hat Nitrat einen stimulierenden Einfluss (Appenroth & Lillo 2003). Ammonium dagegen wirkt sich als vorhandenes Substrat reprimierend auf die Genexpression nitratassimilierender Proteine aus (Fernandez et al. 1989). Die NR kann aber auch auf vielfältige Weise durch Licht reguliert werden (Lillo & Appenroth 2003). Licht bzw. entsprechende Redoxsignale, die aus dem photosynthetischen Elektronentransport stammen, stimulieren die Genexpression des NR-Gens durch erhöhte Transkription. Dies ist von großer Bedeutung für den Energiehaushalt der Zelle, da die Nitratreduktion viel Energie verbraucht und daher die Wirkung des Enzyms NR mit den anderen Teilen des Stoffwechsels koordiniert werden muss. Somit liegt reduziertes Nitrat zum richtigen Zeitpunkt, also bei hoher Photosyntheseleistung, und in geeigneten Mengen zur Verfügung. Die NR kann aber auch nach erfolgter Biosynthese, also post-translational reguliert werden (Kaiser et al. 1999; Lillo & Appenroth 2001). Dies erfolgt, indem die NR im Dunkeln phosphoryliert bzw. im Licht dephosphoryliert wird.

Eine Stickstofflimitierung führt in der Zelle zu einer Reihe physiologischer Veränderungen, z.B. zur Akkumulation von Kohlenstoffreserven (TAG) (Sukenic et al. 1993a), zur Abnahme der Photosyntheserate und zur Abnahme der RUBISO-Aktivität (Hipkin et al. 1983; Sauer et al. 2001), zusätzlich steigt, durch die zunehmende Aktivität von

nitratassimilierenden Enzymen (z.B. NR), die Kapazität Stickstoff zu assimilieren (Hipkin et al. 1983).

1.1.3. Phosphatassimilation

Im Rahmen dieser Arbeit wird parallel zum Einfluss unterschiedlicher Nitratverfügbarkeiten (Kap. 1.1.2.) auch der Einfluss von Phosphat auf die Mikroalge *N. salina* untersucht.

Phosphor ist einer der wichtigsten Makronährstoffe für das Wachstum und den Stoffwechsel der Pflanzen. Das anorganische Orthophosphatanion (PO_4^{3-} ; P_i) ist Bestandteil einer Vielzahl von Metaboliten des Grund- und Sekundärstoffwechsels, dient für die Biosynthese von Nucleinsäuren, Phospholipiden und Zuckerphosphaten, ist durch die Bildung energiereicher Ester an den metabolischen Energieübertragungen beteiligt und wirkt als Regulator der Aktivität von Schlüsselenzymen des Primär- und Sekundärstoffwechsels (Bielecki & Ferguson 1983; Marschner 1995). Es ist ein wichtiges Kontrollsignal von Entwicklungsprozessen in den Pflanzen (Amino et al. 1983) und über reversible Proteinphosphorylierungen ein integraler Bestandteil von Signaltransduktions- und Signalamplifikationsketten (Dietrich et al. 1990).

P_i -Transporterproteine werden in drei Gruppen eingeteilt: Pht1, Pht2 und Pht3 (Karandashov & Bucher 2005). Diese schließen hoch-affine und niedrig-affine P_i -Transporter der Plasmamembran (Pht1) sowie Phosphattranslokatoren in zellulären Organellen (Pht3, Pht2) ein. Es wird allgemein akzeptiert, dass die Aufnahme von P_i über einen H^+ -Symport abläuft und dass dieser Symport auf die Funktion einer Plasmalemma- H^+ -ATPase angewiesen ist (Mimura 1999; Rausch & Bucher 2002). Diese scheidet H^+ unter Verbrauch von ATP (primär-aktiver Transport) aus der Zelle. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Membranpotenzials. In Folge dessen findet die P_i -Aufnahme über einen, durch den elektrochemischen Gradienten getriebenen H^+/P_i -Symport statt (sekundär-aktiver Transport) (Danova-Alt 2008).

Anders als der Transport über die Plasmamembran arbeiten die intrazellulären P-Translokatoren (Pht3, Pht2) mit dem System des Antiports. Dieser wird nachfolgend näher beschrieben.

Der Ablauf vieler physiologischer Prozesse hängt von einer stabilen P_i -Konzentration im Cytoplasma ab. Die Photosynthese und der Verlauf des zentralen Kohlenstoffwechsels während der Licht- und Nachtperiode stehen in enger Verbindung mit der P_i -Homöostase.

Verschiedene Translokatoren in der inneren Hüllmembran der Plastiden transportieren Kohlenstoffgerüste (z.B. Triosephosphate, Hexosephosphate, Phosphoenolpyruvat) im Austausch gegen P_i (Weber et al. 2005). Diese Transportprozesse sind wichtige Schnittpunkte primärer Stoffwechselwege mit den verschiedenen intraorganellen und cytoplasmatischen P_i -Pools der Zelle. Ist die P_i -Homöostase gestört, werden auch die Transportprozesse dieser Metaboliten beeinträchtigt. Beispielsweise werden die während der photosynthetischen CO_2 -Fixierung gebildeten Triosephosphate (Dihydroxyacetonphosphat, 3- Phosphoglycerat) für die Synthese von Saccharose in das Cytoplasma exportiert (Hammond & White 2008). Der Export der Triosephosphate findet über einen Triosephosphat/ P_i -Translokator statt, der gleichzeitig das im Cytoplasma freigesetzte P_i zurück in die Plastiden importiert. Den Import von Phosphoenolpyruvat (PEP) in den Chloroplasten vermittelt ein anderer PEP/ P_i -Translokator. Dort wird PEP zur Synthese von aromatischen Aminosäuren über den Shikimat-Weg verwertet. Aus diesen Beispielen wird ersichtlich, dass P_i -Mangel zum Erliegen zahlreicher physiologischer Prozesse führen kann. Darum sind die cytoplasmatische P_i -Konzentration und die Aufrechterhaltung des P_i -Gleichgewichtes (P_i -Homöostase) durch entsprechende Translokatoren von großer Bedeutung für optimale Wachstumsbedingungen und den physiologischen Status der Zellen. (Danova-Alt 2008)

1.1.4. Fettsäuren und Lipide

Mikroalgen beweisen durch ihre unglaubliche Diversität ihr Anpassungsvermögen an ein breites Spektrum von Umweltbedingungen. Dieses ist u.a. darauf zurückzuführen, dass sie die Fähigkeit besitzen, auf variable Umweltbedingungen durch eine effiziente Änderung ihres Lipidmetabolismus zu reagieren (Guschina & Harwood 2006; Thompson 1996; Wada & Murata 1998). Aufgrund dieses Reaktionsvermögens werden Mikroalgen zunehmend als natürliche Produzenten von Fettsäuren in biotechnologischen Prozessen eingesetzt.

Lipide sind eine heterogene Naturstoffgruppe, die in Organismen einerseits wichtige strukturelle Aufgaben übernehmen, beispielsweise als Bausteine von Membranen, als Kofaktoren von Enzymen oder als Hormone und intrazelluläre Botenstoffe, andererseits als Speicherlipide auch bedeutende Depots organisch gebundener Energie darstellen (Bannwarth et al. 2007).

In fast allen Lipiden sind unverzweigte Monokarbonsäuren mit Kettenlängen zwischen 12 und 20 C-Atomen enthalten – man bezeichnet sie als Fettsäuren. Als Lipide fasst man Fettsäuren

und deren Derivate, sowie Substanzen, die in ihrer Biosynthese oder Funktion zu diesen Komponenten gehören, zusammen (Christie 1989).

Die in den meisten biologischen Strukturen enthaltenen Fettsäuren sind geradzahlig, da ihre Biosynthese jeweils über die Verknüpfung von C₂-Einheiten der aktivierten Essigsäure (Acetyl-Coenzym A) verläuft. Sofern in den Fettsäuren nur C-C-Einfachbindungen vorliegen, spricht man von gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SAFA). Fettsäuren mit einer oder mehreren C=C-Doppelbindungen bezeichnet man als einfach (monounsaturated fatty acids, MUFA) oder mehrfach ungesättigt (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (Bannwarth et al. 2007).

Die Speicherlipide einzelliger Algen, die Triacylglycerole (TAG), sind durch eine hohe Konzentration an SAFA und MUFA charakterisiert und sind ideale Energiespeicher. Da ihre Kohlenstoffatome ungleich stärker reduziert sind als in den Kohlenhydraten, liefert der oxidative Lipidabbau auch mehr als das Doppelte – nämlich 38 kJ g⁻¹ gegenüber nur 17 kJ g⁻¹ bei den Kohlenhydraten (Bannwarth et al. 2007).

Strukturlipide bzw. Membranlipide dagegen haben einen hohen Anteil an PUFA (Sukenik and Carmeli 1990). Zu den Membranlipiden gehören Galactolipide wie z.B. MGDG (Monogalctosyldiacylglycerol) und DGDG (Digalctosyldiacylglycerol) sowie Phospholipide wie z.B. PC (Phosphatidylcholin) und PG (Phosphatidylglycerin). Diese Lipidklassen sind entscheidend am Membranaufbau beteiligt und spielen vermutlich eine bedeutende Rolle in der Erhaltung des Photosynthetischen Elektronentransportsystems. Die MGDG z.B. können bis zu 60 % der Thylakoidmembranen ausmachen (Sukenik and Carmeli 1990). Weiterhin geben die Bindung von MGDG an den PSII-Reaktionszentrum-Komplex (Murata et al. 1990) und die Assoziation von MGDG und SQDG (Sulphoquinovosyldiacylglycerol) mit der ATP-Synthetase (Pick et al. 1987) Hinweise auf eine Beteiligung der Galactolipide am Elektronenfluss und damit verbundenen Aktivitäten (Rawyler & Siegenthaler 1989).

1.1.5. Pigmente

Die Photosynthese, einer der bedeutendsten Prozesse auf der Erde, wird erst durch die Existenz von Pigmenten ermöglicht. Dabei wird die solare Strahlungsenergie in chemische Verbindungen umgewandelt, die dann folgend als Energiereserven zur Verfügung stehen.

Pigmente sind Chromophore (Farbträger), die zusammen mit Proteinen in Komplexen vorliegen und vorwiegend in der Thylakoidmembran zu finden sind.

Generell weisen die überwiegend im wässrigen Milieu beheimateten Algen, im Gegensatz zu den photosynthetischen Organen der Höheren Pflanzen, ein eher vielfältiges Muster an Pigmenten auf. Hauptsächlich trifft diese Vielfalt auf die Karotenoide zu, genauer auf die Gruppe der Xanthophylle, also der sauerstoffhaltigen Karotenoide (Britton 1993). Die Vielfalt der in aquatischen Algen anzutreffenden Lichtsammelpigmente liegt unter anderem in der Notwendigkeit begründet, mit dem Medium Wasser und allen darin enthaltenen Stoffen und Partikeln um die Absorption von Licht konkurrieren zu müssen (Lohr 2000).

Mitglieder der Klasse der *Eustigmatophyceae*, und so auch *N. salina*, unterscheiden sich von anderen Algengruppen wesentlich durch das Fehlen von Chl_b und *c*. Dies hat zur Folge, dass von den sonst vorhandenen Chlorophyllen nur Chl_a neben den Karotenoiden zur Lichtsammlung in den Licht-Sammel-Komplexen (Light Harvesting Complex, LHC) beiträgt. Aus diesem Grunde tragen die Karotenoide wesentlich stärker zur Lichtsammlung bei als in Chl *alb*-haltigen Organismen (Wilhelm 1990). Weiterhin unterscheiden sich die LHC-Proteine der *Eustigmatophyceae* in ihren Pigmentbindungseigenschaften deutlich von denen der Grünalgen und Höheren Pflanzen. So binden die Chl *alb*-(CAB) Proteine der *Chlorophyta* und der Höheren Pflanzen drei- bis fünfmal mehr Chlorophyll- als Karotenoidmoleküle, während die LHC-Proteine der *Eustigmatophyceae* Chlorophyll und Karotenoide etwa im Verhältnis von 2 bis 2,5 binden (Lohr 2000).

Innerhalb der Klasse der *Eustigmatophyceae* stellt Violaxanthin, im Gegensatz zu den anderen Violaxanthin-haltigen Chromophyten, mehr als 50% der Gesamtkarotenoide dar (Owens et al. 1987; Brown 1987, Arsalane et al. 1992). Dieser hohe Violaxanthin-Gehalt ist dadurch erklärbar, dass dieses Pigment in dieser Algenklasse nachweislich Lichtsammelfunktion hat (Owens et al. 1987, Trautman et al. 1990). Weiterhin besitzt die Eustigmatophyte *N. salina* Vaucherixanthin-Ester anstelle von Fucoxanthin als Lichtsammelpigmente (Whittle & Casselton 1975a; Antia & Cheng 1982).

Die beiden wichtigsten Funktionen dieser Pigmente im Rahmen der Photosynthese sind die Lichtsammlung sowie der Schutz des Photosyntheseapparates vor potentieller Schädigung infolge der Lichtanregung (Demmig-Adams et al. 1996; Niyogi 1999).

Karotenoide sind zunächst daran beteiligt, bereits die Entstehung von $^1\text{O}_2^*$ (Singulett-Sauerstoff) zu verhindern, indem sie die Anregungsenergie von $^3\text{Chl}^*$ (Chlorophyll im Triplettzustand) übernehmen und in Wärme umwandeln (Dissipation). Kommt es dennoch zur Bildung von $^1\text{O}_2^*$, so können sie auch diesen über Wärmeabgabe deaktivieren. Diese Deaktivierung ist deshalb so wichtig, weil $^1\text{O}_2^*$ leicht mit den π -Elektronensystemen von Photosynthesepigmenten, ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide, aromatischen

Aminosäuren und Purinen reagieren und durch deren Oxidation zu schweren Zellschädigungen führen können (Krinsky 1979; Knox & Dodge 1985; Siefermann-Harms 1987).

Pflanzen verfügen aber auch über Mechanismen, die bereits die Bildungswahrscheinlichkeit von $^3\text{Chl}^*$ aus $^1\text{Chl}^*$ (Chlorophyll im Singulettzustand) in den Antennenkomplexen herabsetzen. Das verringert die Wahrscheinlichkeit der $^3\text{Chl}^*$ -Bildung, jedoch wird zugleich auch die photochemische Quantenausbeute herabgesetzt. Dieser Mechanismus würde unter Schwachlichtbedingungen einer effektiven Lichtnutzung entgegenstehen und muss deshalb regulierbar sein (Lohr 2000). Ein wichtiges Stellglied ist der durch den photochemischen Elektronentransport induzierte pH-Gradient über die Thylakoidmembran, der ein direktes Maß der Auslastung des Photosyntheseapparates darstellt. Mit zunehmender Protonenkonzentration im Thylakoidlumen wird ein wachsender Anteil der Anregungsenergie in den Lichtsammelantennen in Wärme umgewandelt (Dau & Hansen 1990, Mullineaux et al. 1994, Yahyaoui et al. 1998).

Die photosynthetische Ansäuerung des Thylakoidlumens bewirkt in den Thylakoidmembranen die Bildung bestimmter Xanthophyllspezies, mit der Folge einer deutlichen Verstärkung der nicht-photochemischen Löschung von $^1\text{Chl}^*$. Dieser Prozess ist eine Teilreaktion des sog. Xanthophyllzyklus (*Abb. 1.1.2.*), der im Folgenden eingehender dargestellt werden soll (vgl. auch *Abb. 1.1.3.*).

Die Bezeichnung „Xanthophyllzyklus“ soll ausdrücken, dass Deepoxidierung und Epoxidierung im Licht parallel ablaufen, unter diesen Bedingungen also eine zyklische Umwandlung zwischen Violaxanthin und Zeaxanthin stattfindet (Hager 1975). Im sog. Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin-(VAZ-)Zyklus wird Violaxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert, wobei das Monoepoxid Antheraxanthin eine Zwischenstufe dieser Reaktion ist. Die Deepoxidierung von Violaxanthin wird durch ein im Lumen der Thylakoide lokalisiertes Enzym (Violaxanthin Deepoxidase, VDE) katalysiert, das durch die im Rahmen des photosynthetischen Elektronentransportes bewirkte Ansäuerung des Lumens aktiviert wird (Hager & Holocher 1994). Als Kosubstrat benötigt diese Deepoxidase Ascorbat, welches als Elektronenlieferant für die Reduktion des Epoxidsauerstoffes zu Wasser dient. Dehydroascorbat wird durch Glutathion wieder zu Ascorbat reduziert, die Elektronen hierfür stammen letztlich aus der photosynthetischen Elektronentransportkette (Hager 1975). Die Rückreaktion der Epoxidierung von Zeaxanthin zu Violaxanthin über Antheraxanthin wird von einem Enzym (Zeaxanthin Epoxidase, ZE) katalysiert, das sich auf der Stromaseite der Thylakoidmembran befindet (Hager 1975, Siefermann & Yamamoto 1975) und mit

molekularem Sauerstoff als Kosubstrat (Yamamoto & Chichester 1965) sowie NADPH als Elektronendonator (Hager 1975) arbeitet.

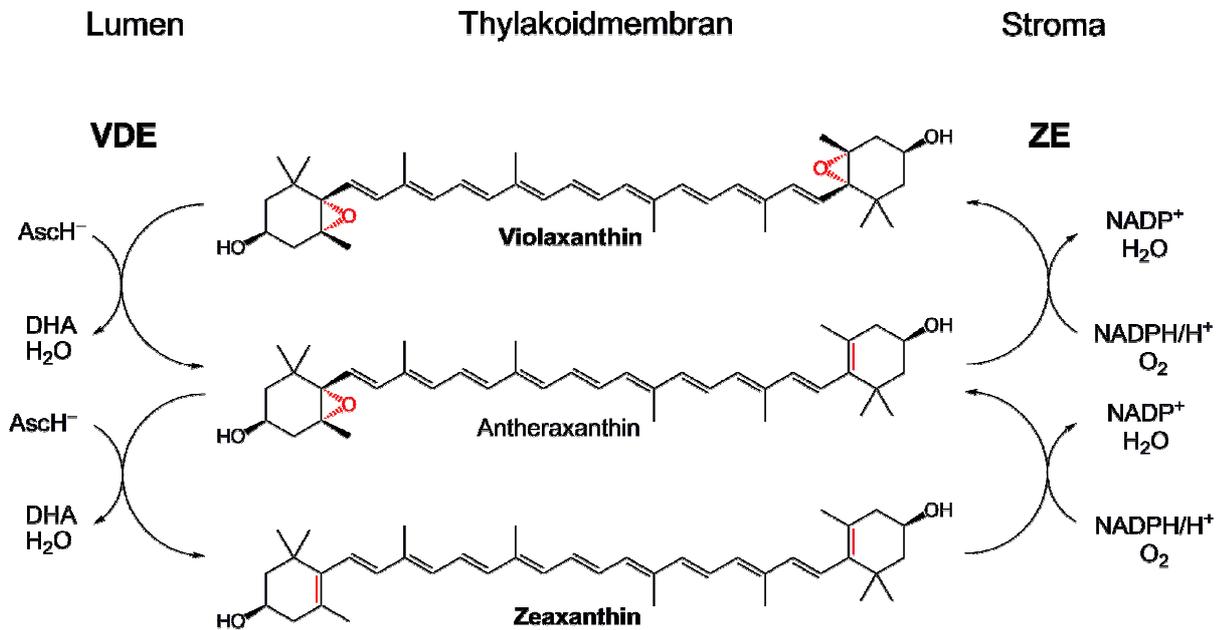


Abb. 1.1.2. Übersicht über den Xanthophyllzyklus (aus <http://commons.wikimedia.org>). Die Umwandlung von Zeaxanthin zu Violaxanthin wird von einer Zeaxanthin-Epoxidase (ZE), die Umkehrreaktionen von einer Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) katalysiert. Die Enzyme liegen membrangebunden im Stroma bzw. Lumen des Chloroplasten vor. AscH⁻ = Ascorbat; DHA = Dehydroascorbinsäure.

Jedoch bleibt die Rolle des VAZ-Zyklus in Eustigmatophyceen bei der Photoprotektion noch näher zu untersuchen. Zum Beispiel ergaben Analysen von Lohr (2000) und Lubián & Montero (1998) mit *N. salina* bzw. *N. gaditana* während längeren Starklichtinkubationen, dass nur ein verhältnismäßig geringer Anteil an Vx deepoxidiert wird. Demnach ist der auch im Starklicht unverändert hohe Vx-Gehalt höchstwahrscheinlich auf eine feste Bindung dieser Pigmentmoleküle an die LHC-Komplexe zurückzuführen, die ihrer Deepoxidierung entgegensteht (Lohr 2000).

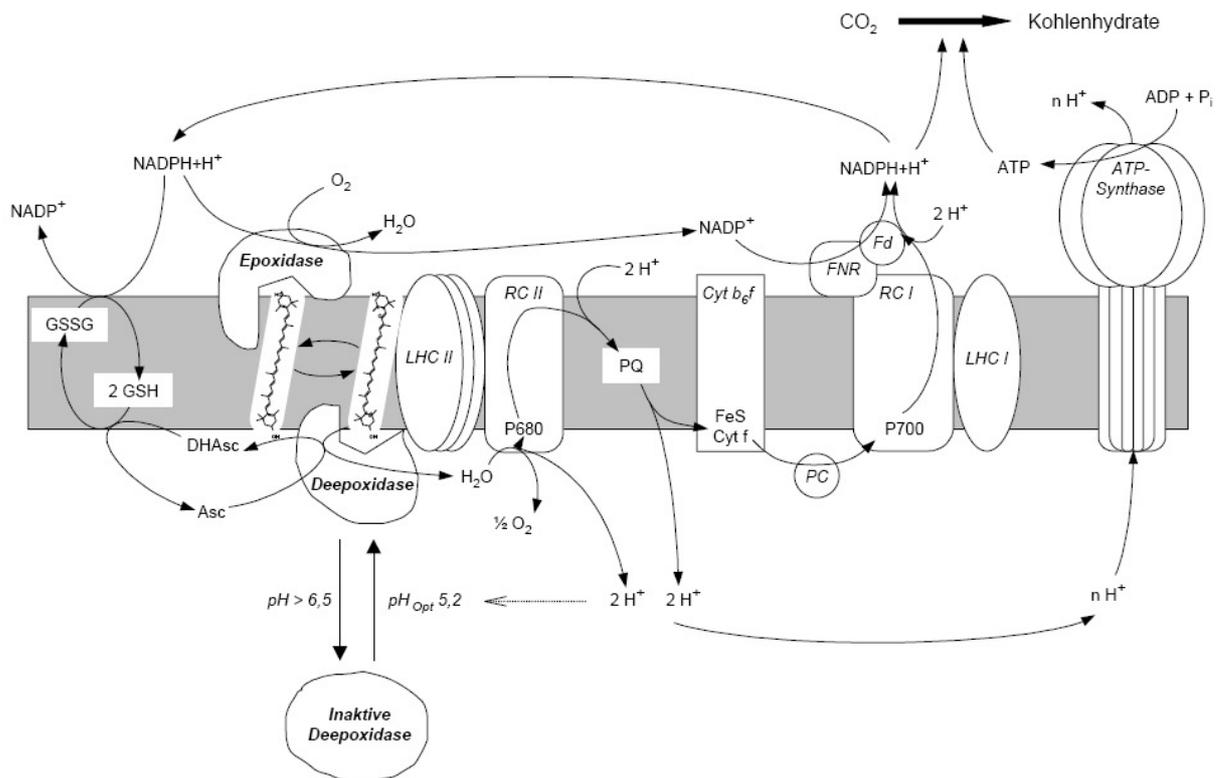


Abb. 1.1.3. Beziehungen zwischen dem Xanthophyllzyklus und dem photosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran (nach Hager & Holocher 1994). Asc = Ascorbat, DHAsc = Dehydroascorbat, Fd = Ferredoxin, FNR = Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, GSH = Glutation, GSSG = oxidiertes Glutathion, PC = Plastocyanin, PQ = Plastochinon-Pool, RC I bzw. RC II Reaktionszentrumkomplex von PSI bzw. PSII.

1.1.6. Tocopherol

Hinter den Begriffen Tocopherol bzw. Tocochromanol bzw. Vitamin E verbirgt sich eine Stoffgruppe von acht natürlich vorkommenden Substanzen. Es werden zwei Untergruppen unterschieden, die Tocotrienole, die eine ungesättigte Seitenkette haben, und die Tocopherole, deren Seitenkette gesättigt ist (Abb. 1.1.4.). Ihnen gemein ist der Aufbau aus einer hydrophilen Kopfgruppe, dem Chromanolring, sowie der lipophilen Seitenkette. Innerhalb beider Gruppen werden jeweils vier Formen (α -, β -, γ - und δ) unterschieden, die in Position und Anzahl der am Chromanolring substituierten Methylgruppen variieren (Abb. 1.1.4.).

Es ist bekannt, dass Tocopherole von photosynthetisch aktiven Organismen synthetisiert werden können. Mit Ausnahme einiger aus der Gruppe der Cyanobakterien stammenden Arten, wie z.B. *Anacystis nidulans* und einigen *Synechococcus* Spezies (Sattler et al 2003),

sind bis heute keine Beispiele für die Existenz von phototrophen Organismen ohne Tocopherol-Synthese geliefert worden. Es gibt jedoch Hinweise auf die Anwesenheit von Tocopherol in der, durch Mutation hervorgerufene, nicht-photosynthetisch aktiven Mikroalge *Euglena gracilis* (Kusmic et al. 1999). Hier konnte die Synthese mit nicht-photosynthetischen Strukturen, wie dem mitochondrialen System, assoziiert werden.

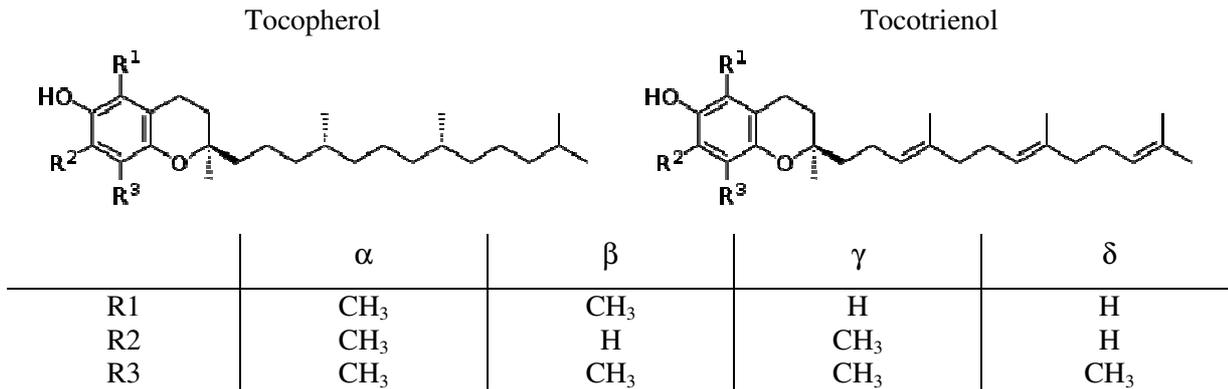


Abb. 1.1.4. Strukturen der Tocopherol- und Tocotrienolverbindungen. Die Übersicht zeigt die unterschiedlichen Substitutionsmuster am Chromanolring für die α -, β -, γ - und δ -Formen.

Die genaue Bedeutung der Tocopherole für Höhere Pflanzen, Algen und Cyanobakterien ist bis heute nicht umfassend und eindeutig geklärt. Die Funktionen der Tocopherole scheinen vielfältig sein. So sind Tocopherole am Schutz vor antioxidativen Prozessen beteiligt (Munné-Bosch & Alegre 2002; Schneider 2005; Maeda et al. 2006), übernehmen aber auch nicht-antioxidative Funktionen (Signaltransduktion, Wechselwirkung mit Phytohormonen) (Kusmic et al. 1999; Munné-Bosch 2005). In der Gruppe der lipidlöslichen Substanzen ist α -Tocopherol die am häufigsten auftretende Form in der Natur und besitzt das größte antioxidative Potential (Shintani et al. 2002). Die Wirkung erfolgt über zwei Mechanismen. Neben ihren lipophilen Eigenschaften sind Tocopherole in der Lage, ein Elektron abzugeben. Dabei entsteht ein resonanzstabilisiertes Tocopheroxylradikal (KamalEldin & Appelqvist 1996). In dieser Hinsicht sind Tocopherole einzigartig im Vergleich zu anderen phenolischen Antioxidantien, wie Hydroxyquinone. Diese müssen zwei Elektronen abgeben, um eine stabile Struktur zu erhalten (Sattler et al. 2003). Tocopherole können aber auch zwei Elektronen abgeben, wobei sich der Chromanolring öffnet und ein Tocoquinon-Derivat entsteht. Die Kombination dieser beiden Mechanismen ermöglicht Tocopherol z.B., mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor einer Lipidperoxidation zu schützen, indem die Lipidperoxyl-

Radikale abgefangen werden, welche sonst eine Lipidperoxidation-Kettenreaktion bewirken würden (Liebler 1993; Schneider 2005; Maeda et al. 2006). Darüber hinaus kann es durch seine Eigenschaften als Radikalfänger mit reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) reagieren (Munné-Bosch & Alegre 2002). Aufgrund ihrer Lokalisation wurde angenommen, dass sie speziell in Plastiden, in denen ständig reaktive Sauerstoffspezies entstehen, Schutzfunktionen übernehmen. Zum Beispiel findet unter hohen Lichtintensitäten, aufgrund des überreduzierten Plastoquinonpools und der Plastoquinon-Akzeptoren Q_A und Q_B , eine verstärkte Triplett-Bildung des PSII ($^3\text{Chl}^*$) statt. Diese wiederum können singulären Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) generieren, welcher zu einer Degradation des D1 Proteins des PSII führen kann (Janssen et al. 1999). α -Tocopherol wirkt den daraus resultierenden Effekten (z.B. Entkopplung der Pigmente vom PSII (Trebst et al. 2002)) durch die Oxidation des $^1\text{O}_2^*$ entgegen (Trebst et al. 2002; Kruk et al. 2005). Da diese Reaktion irreversibel ist, müssen die Zellen α -Tocopherol regenerieren (z.B. mit Vitamin C), um diesen Schutzmechanismus aufrecht zu erhalten (Smirnoff 2000).

Es wird auch diskutiert, dass Tocopherole, die sich aufgrund ihrer amphipathischen Molekülstruktur (polare Chromanol-Kopfgruppe und lipophile Isoprenoid-Seitenkette) gut in Membranen einlagern können, regulatorischen Einfluss auf die Membranfluidität ausüben und sich damit auf die Kältetoleranz von Pflanzen auswirken (Wang & Quinn 2000; Munné-Bosch & Alegre 2002; Bradford et al. 2003; Hinch 2008).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Kultivierung von *Nannochloropsis salina* (*N. salina*)

Die Mikroalge *N. salina* wurde erstmalig von Hibberd (1981) beschrieben, welcher sie in die Klasse der *Eustigmatophyceae* und die Familie der *Monodopsidaceae* einordnete. Bezogen wurde die Mikroalge aus der Algenkultursammlung Göttingen SAG (strain 40.85).

2.1.1. Diskontinuierliche Kultivierung in einer „batch“-Kultur

N. salina wurde in einer 1 L-Schottflasche (Schott, Mainz, D) bei 22 °C und Dauerlicht (150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert. Die Lichtintensität wurde an der Oberfläche der Kulturflasche mit einem sphärischen Sensor (US-SQS/LI, Walz, Effeltrich, D) ermittelt. Das Kulturmedium bestand aus künstlichem Seewasser (32 ‰, Tropic Marin[®], Tagis Tropical Marin, Dreieich, D) und war angereichert mit der 8-fachen Konzentration an Nährstoffen eines F/2 Mediums (Guillard & Ryther 1962, Tab. 2.1.1).

Tab. 2.1.1. F/2- Medium nach Guillard & Ryther (1962)

Lösungskomponente			
Tropic Marin32 (TM32)		32	g
NaNO ₃		0.150	g
K ₂ HPO ₄		0.015	g
ZnSO ₄ *H ₂ O	} M1	30	μg
CuSO ₄ *5H ₂ O		20	μg
CoSO ₄ *7H ₂ O		24	μg
MnSO ₄ *H ₂ O		400	μg
FeCl ₃ *6H ₂ O	M2	1	mg
EDTA Titriplex III	M3	10	mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	M4	13	μg
H ₂ O	ad	1000	ml

Alle Komponenten für das F-Medium, mit Ausnahme von Tropic Marin[®] (Tagis Tropical Marin, Dreieich, D) wurden von der Fa. Merck (Darmstadt, D) bezogen.

Durch kontinuierliche Zugabe von reinem CO₂ über einen Begasungsschlauch wurde der pH-Wert dahingehend beeinflusst, dass nach Beenden des „batch“-Prozesses die Vorkulturen einen pH-Wert von 8.5 ± 0.5 hatten.

Die Dauer der Kultivierung betrug 10 bis 14 Tage und die Kulturen erreichten eine optische Dichte (OD, *Kap.* 2.3.2.) von 11 bis 16.

2.1.2. Kontinuierliche Kultivierung im Photobioreaktor

2.1.2.1. Aufbau des Photobioreaktors

In der Arbeit wurde ein Reihenphotobioreaktor (RPBR), entwickelt von Marxen et al. (2005), verwendet.

Der Photobioreaktor erlaubt die Kultivierung von Mikroalgen in Frisch- und Salzwassermedien. Ein Prozessleitsystem sorgte für die Kommunikation zwischen Aktoren (z.B. Pumpen, Ventile) und Sensoren und ermöglichte die Kultivierung unter Einhaltung definierter Bedingungen (z.B. Temperatur, pH, Licht).

Insgesamt standen vier voneinander unabhängig betriebene Reaktoren für die Experimente zur Verfügung. Im Folgenden wird ein einzelner Reaktor, mit seinen für diese Arbeit wichtigsten Funktionen vorgestellt (*Abb.* 2.1.1.).

Zwei senkrecht stehende, am oberen und unteren Abschnitt durch ein PVC-Stück miteinander verbundene Glasröhren (SIMAX- Glas, Kavalier, Sazava, CZ) mit einem Fassungsvermögen von 6 L bildeten eine Reaktoreinheit. Die Zirkulation im Reaktor wurde über den Anschluss von Begasungsschläuchen im unteren Abschnitt der Reaktoren ermöglicht. Mithilfe eines Strömungsreglers (DK800N, Krohne, Duisburg, D) wurde der Reaktor mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 8 L h^{-1} mit Luft begast.

Ein pH-Regler (dTrans pH01, Jumo, Fulda, D) regelte den pH-Wert im Kulturmedium, indem er ein CO₂-Ventil (Bürkert, Ingelfingen, D) ansteuerte, um die für die pH-Konstanthaltung im Reaktor notwendige CO₂-Konzentration im Luftstrom beizumischen.

Photosynthetisch aktives Licht (PAR) wurde von zwei Leuchtstoffröhren (TL58W/25, Osram, München, D), welche hinter den Glasröhren angebracht sind, erzeugt. Die PAR-Intensitäten sind von 0 bis $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ einstellbar.

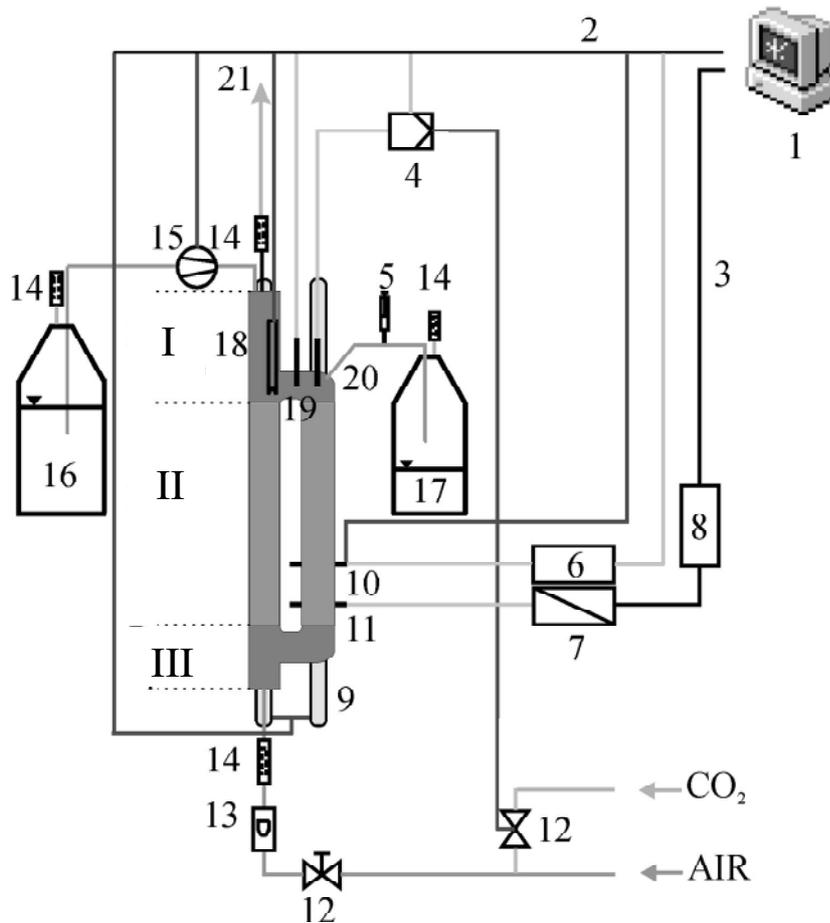


Abb. 2.1.1. Technischer Aufbau eines einzelnen Photobioreaktors (aus Marxen et al. 2005). I = oberer Abschnitt; II = mittlerer Abschnitt; III = unterer Abschnitt; 1 = PC; 2 = Feldbus; 3 = serielle Schnittstelle (RS232); 4 = pH-Regler; 5 = Probennahme; 6 = PAM-101; 7 = Analog/ Digital-Wandler; 8 = RS232-Wandler; 9 = Lichtquelle mit PAR-Licht; 10 = Fluoreszenz-Sonde; 11 = Sonde für die optische Dichte; 12 = CO₂-Ventil; 13 = Strömungsregler; 14 = Sterilfilter; 15 = Pumpe; 16 = Reservoir mit Frischmedium; 17 = Überlauf; 18 = Heizstab; 19 = Temperatur- Sonde; 20 = pH-Sonde; 21 = Abluft.

Die Reaktortemperatur entsprach der Umgebungstemperatur, die im Labor auf 21 °C ± 1 °C konstant gehalten wurde. Temperaturen über 21 °C konnten durch den Einsatz von Heizstäben (Sicce, 50 W, Pozzoleone, I) eingestellt werden. Temperaturen unter 21 °C konnten durch den Einsatz von wassergekühlten Silikonschläuchen erreicht werden. Die Wasserkühlung wurde durch ein Kühlaggregat (Julabo F32, Labortechnik GmbH, Seelbach, D) gewährleistet, an dem die Silikonschläuche angeschlossen waren. Heizstäbe und Kühlschläuche sowie die Sensoren für Temperatur (PT-100, Prosensor, Amanvillers, F) und pH (2GEP-2-GV-U-0, Jumo, Fulda, D) waren im oberen Reaktorabschnitt installiert.

Die Messstrecke zur Bestimmung der optischen Dichte bestand aus einer LED (Light Emitting Diode, 870 nm, HSDL-4230 17°, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) und einer Photodiode mit Tageslicht-Filter (SFH 205 F, Siemens, München, D). Die Wellenlänge von 870 nm wurde eingesetzt, weil sie nur in geringem Maße durch die Absorption der Mikroalgenpigmente beeinflusst wird.

Die so gemessene optische Dichte kann geregelt werden, indem bei Überschreiten eines Soll-Wertes eine Pumpe (WM101, WatsonMarlow, Cornwall, UK) aktiviert wird, die neues Medium in den Reaktor fördert und so zu einer Verdünnung der optischen Dichte führt.

Ein Überlauf kontrollierte, durch passives Ableiten der Reaktorsuspension, den Füllstand im Reaktor. Die Sonde zur Bestimmung der optischen Dichte ist im unteren Bereich der nicht begasten Glasröhre angebracht, um negative Einflüsse von Gasblasen auf die Signalerfassung auszuschließen.

2.1.2.2. Kultivierungsparameter für den turbidostatischen Prozess

Die Konstanthaltung der biologischen Trockenmasse (BTM) ist ein Hauptmerkmal der turbidostatischen Prozessführung. Für das Herausarbeiten der Einflüsse von Temperatur und Nährstoffverfügbarkeit ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass die Lichtintensität pro Zelle konstant bleibt, was mit einer konstanten BTM erreicht wird, mit der Annahme, dass die Zellzahl damit auch konstant bleibt. Zusätzlich wurde die optische Dichte so gewählt, dass eine Lichtlimitierung ausgeschlossen werden kann.

Die optische Dichte wurde bei allen Experimenten bei einem Soll- Wert von 1 ± 0.01 geregelt. Ein pH-Wert von 8.2, eine PAR-Intensität von $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und eine Begasung von 8 L h^{-1} wurden bei allen Experimenten eingestellt. Für das Inokulum wurden Vorkulturen (*Kap. 2.1.1.*) verwendet.

Basismedium aller Experimente bildete das doppelt konzentrierte F/2-Medium (*Tab. 2.1.1*) nach Guillard & Ryther (1962). Dieses wurde über einen UV-C Wasserklärer (AquaCristal UV-C 9W, JBL, Neuhofen, D) entkeimt und mithilfe einer Pumpe (505Di, WatsonMarlow, Cornwall, UK) in die Reaktoren gepumpt.

2.2. Konzeption der Experimente

Zur Erfassung des Einflusses variierender Nitrat- und Phosphatkonzentrationen in Kombination mit verschiedenen Kultivierungstemperaturen wurden für die Experimente folgende Ansätze gewählt:

Die Referenz (REF) der Nitrat- und Phosphatexperimente, im Laufe der Arbeit auch als Vollmedium bezeichnet, entsprach den Konzentrationen wie in *Tab. 2.1.1.* angegeben. Nitrat wurde mit $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$ und Phosphat mit $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ eingesetzt.

Für die **Experimente mit unterschiedlichen Nitratangeboten** kamen folgende Nitratkonzentrationen zum Einsatz (zur Vereinfachung im weiteren Verlauf des Textes als nitratlimitiert bezeichnet); diese wurden wie folgt gekennzeichnet:

$$N_{75} = 75 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$$

$$N_{150} = 150 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$$

$$N_{300} = 300 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$$

$$N_{600} = 600 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$$

Für die **Experimente mit unterschiedlichen Phosphatangeboten** kamen folgende Phosphatkonzentrationen zum Einsatz (zur Vereinfachung im weiteren Verlauf des Textes als phosphatlimitiert bezeichnet); diese wurden wie folgt gekennzeichnet:

$$P_6 = 6 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$$

$$P_{12} = 12 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$$

$$P_{25} = 25 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$$

$$P_{50} = 50 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$$

Die Referenz und die Experimente mit variierenden Nitrat- und Phosphatangeboten fanden bei **Temperaturen** von $17 \text{ }^\circ\text{C}$, $21 \text{ }^\circ\text{C}$, $26 \text{ }^\circ\text{C}$ und $29 \text{ }^\circ\text{C}$ statt.

2.3. Bestimmung physiologischer Parameter

2.3.1. Fluoreszenzmessungen

Zur Generierung der Fluoreszenzsignale F und F_M' (siehe Nomenklatur von Kooten & Snel, 1990) bzw. der Bestimmung der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} wird das Messprinzip der PulsAmplitudenModulation (PAM) verwendet.

Diese PAM-Methode benötigt zwei Lichtquellen, das Messlicht (ML) und das sättigende aktinische Licht (SAL) (Abb. 2.1.2.).

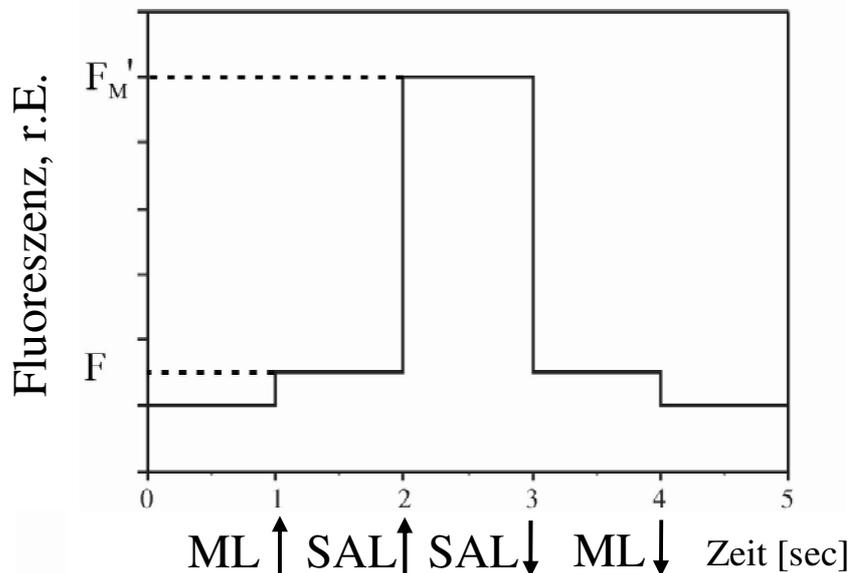


Abb. 2.1.2. Lichtprotokoll idealisierter Antworten auf Fluoreszenzsignale (nach Marxen et al. 2005). Details von Fluoreszenzkinetiken sind nicht dargestellt. Aufgrund der Zirkulation der Mikroalgen bleibt das F_M' -Signal während des Sättigungspulses nahezu konstant.

F_M' = Maximafluoreszenz, alle PSII-Reaktionszentren sind geschlossen; F = aktuelle Fluoreszenz; ML = Messlicht; SAL = sättigendes aktinisches Licht

Das intensitätsschwache Messlicht (LED) besitzt ein Emissionsmaximum im Rotbereich (online λ_{\max} = 650 nm; inline λ_{\max} = 630 nm) des sichtbaren Wellenlängenspektrums und wird mit einer hohen Frequenz (100 kHz) geschaltet. Durch die geringe Intensität ($< 0.5 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und der hohen Frequenz des Messlichts kommt es zu keiner Änderung des Redoxzustandes der Elektronen-Transport-Kette (ETC) hinter dem Photosystem II (PSII).

Zusätzlich absorbiert ein Kurzpassfilter längerwellige Anteile des Messlichts ($\lambda < 670$ nm), so dass diese keinen Einfluss auf den Photodetektor nehmen können.

Das sättigende aktinische (d.h. den Redox-Zustand der ETC beeinflussende) Licht (SAL) sorgt durch seine hohe Intensität ($2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) dafür, dass alle Reaktionszentren des Photosystems II (PSII) geschlossen sind, um die Maximalfluoreszenz zu generieren. Die Pulsdauer des sättigenden Lichtes betrug *online* 800 ms und *inline* 1 sec.

Eine Photodiode (Fluoreszenzdetektor), durch einen Langpassfilter (> 695 nm) zusätzlich geschützt, detektiert das emittierte Fluoreszenzlicht (> 700 nm) des Photosystem II (PSII) der Mikroalge und sendet ein analoges Signal an ein Chlorophyll-Fluorometer.

Sobald die Mikroalgen mit Hintergrundlicht (hier $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, *Kap. 2.1.2.2.*) bestrahlt werden, wird bei Einstrahlung des Messlichtes die aktuelle Fluoreszenz F bzw. bei zusätzlichen sättigendem Licht die Maximalfluoreszenz F_M' induziert.

Durch eine Korrelation des Detektorausgangssignals mit dem Messlicht kann die induzierte PSII-Fluoreszenzantwort der Mikroalgen (bezogen auf das Messlicht) vom Einfluss des Hintergrundlichts und des Sättigungspulses isoliert betrachtet werden.

Um den physiologischen Zustand der kultivierten Mikroalgen zu erfassen, wird die photochemische Effizienz ϕ_{PSII} des Photosystems II (PSII) nach *Gleichung 2.1.* (Genty et al. 1989, Schreiber et al. 1994) mithilfe der Fluoreszenzsignale F und F_M' berechnet.

$$\phi_{\text{PSII}} = (F_M' - F) / F_M' \quad (2.1.)$$

2.3.1.1. *Online*-Messungen

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde mit dem Mini-Pam (Walz, Effeltrich, D) durchgeführt. Für die Messung wurde die Sonde direkt an den Glasröhren im mittleren Abschnitt (*Abb. 2.1.1.*) in Position gebracht. Die *online*-Messungen ($n=3$) erfolgten parallel zur täglichen Probenahme einmal am Tag. Einstellungen und technische Ausstattung der *online*-Messungen wurden in *Kap. 2.3.1.* beschrieben.

2.3.1.2. *Inline*-Messungen

Die Chlorophyllfluoreszenz von lichtadaptierten Mikroalgen wurde kontinuierlich alle 10 Minuten über den gesamten Prozesszeitraum hinweg erfasst. Die Sonde zur Bestimmung der

Chlorophyll-Fluoreszenz ist im unteren Abschnitt (*Abb. 2.1.1.*) der nicht begasten Glasröhre angebracht, um negative Einflüsse von Gasblasen auf die Signalerfassung auszuschließen.

Das bereits korrelierte Analogsignal des PAM-101 (Walz, Effeltrich, D) wird an den PC gesendet. Eine spezielle Software analysiert das Signal hinsichtlich F und F_M' und berechnet die photochemische Effizienz ϕ_{PSII} des PSII (*Gleichung 2.1.*), um den physiologischen Zustand der kultivierten Mikroalgen zu erfassen.

Einstellungen und technische Ausstattung der *inline*-Messungen wurden in *Kap. 2.3.1.* beschrieben. Zum Aufbau und Betrieb der *inline*-Fluoreszenzsonde siehe Marxen et al. (2005).

2.3.2. Bestimmung der optischen Dichte (OD) *offline*

Die optische Dichte einer Probe (2 ml) wurde mit einem Spectrophotometer (U-1100, HITACHI, Tokyo, J) bei 750 nm gemessen. Ab einem Wert über 0.8 wurden die Proben mit Tropic Marin (32 ‰) verdünnt.

2.3.3. Bestimmung der Biologischen Trockenmasse (BTM)

Jeweils 2 ml einer Probe wurden über vorgeglühte und gewogene Glasfaser Mikrofilter (GF/C, Ø 25 mm, Whatman, Brentfort, UK) filtriert, anschließend bei 104 °C für 24 h getrocknet und erneut gewogen. Die resultierende Gewichts Differenz wurde zur Berechnung der BTM herangezogen. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen.

2.3.4. Bestimmung der Wachstumsrate (μ)

Während eines turbidostatischen Prozesses kann die Wachstumsrate der kultivierten Mikroorganismen wie folgt dargestellt werden:

$$\mu = \Delta V_R / (V_L \cdot \Delta t) \quad (2.2.)$$

wobei μ die Wachstumsrate, V_L das Volumen im Reaktor, ΔV_R die Differenz zugeführten Volumens an Frischmedium und Δt das betrachtete Zeitintervall sind. Die Wachstumsraten wurden mit einem $\Delta t = 24$ h berechnet.

2.3.5. Bestimmung der Fettsäurekonzentration und des Fettsäuremusters

Nach den Probenahmen wurden die Proben bei 4000 rpm für 30 min bei 4 °C und ohne Bremse zentrifugiert (Varifuge 3.0, Heraeus, Hanau, D). Die nun im Pellet vorliegenden Reaktorproben wurden bei – 80 °C für 24 h gelagert und anschließend im Gefriertrockner (FREEZE-DRY™ MP, FTS® Systems, Inc., New York, USA) bei – 90 °C getrocknet. Bis zur weiterverarbeitenden Analyse lagerten die trockenen Proben bei - 80 °C.

Die quantitative und qualitative Bestimmung der Fettsäuren erfolgte anhand der von Garcés und Mancha (1993) angegebenen Methylierungsmethode mithilfe der Gaschromatographie.

Probenvorbereitung:

Für die Aufbereitung wurden 45 ml Mikroalgensuspension, das entsprach etwa 10 mg gefriergetrockneter Biomasse, mit 2 ml Methylierungsgemisch bestehend aus Methanol, Toluol, konzentrierter Schwefelsäure und 2,2-Dimethoxypropan im Verhältnis 39:10:2:1 (v/v/v/v) versetzt. Dem Methylierungsgemisch schon zugegeben, waren die internen Standards Nonadecansäure (C19:0) mit 1000 ppm und Tricosansäure (C23:0) mit 500 ppm. Zu diesem Ansatz wurden 1.5 ml Hexan gegeben. Die Proben wurden mit Stickstoff überschichtet und nach 5 min im Ultraschallbad (RK100H, Bandelin, Berlin, D) für 2 h in einen temperierten (80 °C) Thermoblock (2050-1CESUP, Barnstead/Lab-Line, Melrose Park, IL, USA) gestellt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur bildeten sich zwei Phasen. Die Oberphase, die Methylester enthaltend, wurde abgenommen und mit Stickstoff begast und evaporiert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben in 0.5 ml Hexan aufgenommen. Jeweils 1 µl des Resuspensionsvolumens wurde für die Injektion in den Gaschromatographen per Hand aufgezogen und injiziert.

Gaschromatographie:

Die Fettsäuremethylester wurden mit einem Gaschromatographen (GC-14B, Shimadzu, Kyoto, J), ausgestattet mit einem FID (Flammenionisationsdetektor) und einer Kapillarsäule FS-CW 20M-CB (30 m x 0.25 mm x 0.31 µm, CS-Chromatographie; Langerwehe, D) durchgeführt. Die Injektor- und die Detektortemperatur betrug 250 °C bzw. 280 °C. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,3 ml min⁻¹ verwendet und das Splitverhältnis war 1:50. Der Ablauf des Temperaturprogramms wurde wie folgt festgelegt: 80 °C für 0.5 min, für 25 °C min⁻¹ auf 200 °C und mit 3 °C min⁻¹ auf 230 °C für 17 min.

Die Fettsäuren wurden über den Vergleich der Retentionszeiten bekannter Standards (Supelco™ 37 Component Fame Mix und PUFA Marine Source, beide Supelco, Duisburg, D) identifiziert. Die quantitative Analyse erfolgte über den Vergleich der Peakflächen der internen Standards (C19:0, C23:0).

Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm Shimadzu GCsolution (Version 2.3). Von allen Proben wurden Duplikate analysiert.

Die Summe der Konzentration aller gaschromatographisch analysierten Fettsäuren einer einzelnen Kultur wird als Gesamtfettsäurekonzentration (TFA, total fatty acids) bezeichnet. Die TFA werden in dieser Arbeit eingeteilt in gesättigte (SAFA, saturated fatty acids), einfach ungesättigte (MUFA, monounsaturated fatty acids) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, polyunsaturated fatty acids).

2.3.6. Bestimmung der Pigmentkonzentration

Die Methode zur Trennung und Quantifizierung der Pigmente basiert auf Mantoura & Llewellyn (1983) und wurde in der von Barlow et al. (1990) modifizierten Form benutzt.

Probenvorbereitung:

Für die Aufbereitung wurden 10 ml Mikroalgensuspension, das entspricht etwa 2 mg gefriergetrockneter Biomasse (*Kap. 2.3.5.*), wurden mit Edelstahlkugeln (3 mm, Nanoball, Wermelskirchen, D und 1.2 mm, Roth, Karlsruhe, D) und mit 0.5 ml bis 1 ml Aceton (100 %) versetzt. Der mechanische Aufschluss erfolgte mit der Schwingmühle MM2 (Retsch, Haan, D) für 2 x 5 min bei 20 Hz (1200 min⁻¹). Die Extrakte wurden durch einen 0.2 µm PTFE-Filter (A-Z Analytik, Langen, D) in lichtundurchlässige Glasvials filtriert.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Pigmentanalyse werden 50-200 µl des Extraktes in das HPLC-System (P4000 Pumpe, AS3000 Autosampler, Controller SN4000, Thermo Separation Products, USA) injiziert. Die Pigmente wurden in einer C18-Nucleosil-Säule (CS-Chromatographie; Langerwehe, D) über einen Polaritätsgradienten bei einer Flussrate von 1.5 ml min⁻¹ aufgetrennt. Für den Gradienten wurden zwei Lösungsmittelgemische benötigt: A (80:10:10 Methanol: 1 M Ammoniumacetat: Wasser), B (60:40 Methanol:Aceton). Die Messung erfolgte über

Spektralphotometrie (SpectraFocus, Thermo Separation Products, USA) im Bereich von 400 – 700 nm.

Die Software ChromQuest 4.1 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D) diente der Analyse der Chromatogramme. Die Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucheriaxanthin (Vaux), β - Karotin und Zeaxanthin (Zx) wurden über den Vergleich mit externen Pigmentstandards (DHI Water & Environment, Hørsholm, DK) identifiziert. Von allen Proben wurden Triplikate analysiert.

2.3.7. Bestimmung der α -Tocopherolkonzentration

Die Extraktion und die quantitative Bestimmung von α -Tocopherol erfolgte nach Backasch et al. (2005).

Probenvorbereitung:

Für die Aufbereitung wurden 10 ml Mikroalgensuspension, das entspricht etwa 2 mg gefriergetrockneter Biomasse (3.3.5.), wurden mit Edelmesskugeln (3 mm, Nanoball, Wermelskichen, D und 1.2 mm, Roth, Karlsruhe, D) und 150 μ l Heptan versetzt. Der mechanische Aufschluss erfolgte mit dem 2000 Geno/Grinder (SPEX CertiPrep, Metuchen, N.J. USA) 2 x 1 min bei 1100 rpm. Anschließend wurden die Proben 2 h bei -20 °C für eine vollständige Extraktion gelagert.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Analyse des α -Tocopherols werden 20 μ des Extraktes in das HPLC-System (510 HPLC Pumpe, Waters, Milford, USA; SIL-10ADVP Autosampler, Shimadzu, Kyoto, J) injiziert. α -Tocopherol lief über eine LiChrospher® Si60 (5 μ m) HPLC-Säule (Merck, Darmstadt, D) und wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm (RF-10AXL Fluoreszenzdetektor, Shimadzu, Kyoto, J) und einer Anregungswellenlänge von 290 nm detektiert. Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹ mit Heptan/ Isopropanol (99:1; v/v) als Laufmittel. Die Class VP software (Shimadzu, Kyoto, J) diente der Analyse der Chromatogramme. α -Tocopherol wurde über den Vergleich mit externen Tocopherolstandards (Merck, Darmstadt, D) identifiziert. Von allen Proben wurden Triplikate analysiert.

2.4. Bestimmung physiologisch relevanter Nährstoffe

2.4.1. Bestimmung der Kohlen- und Stickstoffkonzentration in der Zelle

Jeweils 2 ml einer Probe wurden über vorgeglühte und vorgewogene Glasfaser Mikrofilter (GF/C, Ø 25 mm, Whatman, Brentfort, UK) filtriert und anschließend bei 104 °C für 24 h getrocknet.

Die in eine Zinnkapsel (TC/N/S) eingewogene Probe wird durch den automatischen Probengeber in das Reaktionsrohr eingebracht (CHN-Euro EA Elemental Analyzer, EuroVector Instruments & Software, Milan, I). Dort wird die Probe unter Sauerstoffzugabe und unterstützt durch die exotherme Oxidation der Zinnkapsel verbrannt (Reaktortemperatur 1021 °C). Helium (80 ml min^{-1}), als Trägergas transportiert die Reaktionsgase (N_2 , NO_x , CO_2) über Wolframoxid als Oxidationskatalysator im oberen Teil des Reaktors, dann über Kupfer im unteren Teil. Am Kupfer wird NO_x zu N_2 reduziert (Reduktionstemperatur 680 °C). Bei C/N-Messungen werden die Reaktionsgase über Chromoxid und versilbertes Kobaltoxid transportiert und anschließend in einem zweiten mit Kupferoxid gefüllten Rohr reduziert. Die Reaktionsgase werden in einer chromatographischen Trennsäule (Säulenofen 50 °C) aufgetrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor detektiert (EA Manual). Die Flächen der „peaks“ werden vom Datensystem integriert und mit den Kalibrationsdaten in Konzentrationen umgerechnet. Für die Auswertung der intrazellulären Kohlenstoffkonzentrationen (C_{Cintra}) und Stickstoffkonzentration (C_{Nintra}) wurden pro Reaktor und Tag aus zeitlichen Gründen Einzelproben genommen.

Zur Kalibrierung des Elementar-Analysegerätes wurden Acetanilid-Proben mit bekannten C-, H- und N-Gehalt abgewogen, in Zinnfolie verschlossen und analysiert. Als Blindwerte wurden vorgeglühte und vorgewogene Filter aus derselben Charge wie die Probenfilter analysiert.

2.4.2. Bestimmung der Nitratkonzentration im Medium (DIN/ DON)

Nach den Probenahmen wurden die Mikroalgen durch Zentrifugation (*Kap.* 2.3.5.) vom Kulturmedium getrennt. Danach wurde das Medium durch einen Filter (GF/C, Ø 25 mm, Whatman, Brentfort, UK) filtriert. Abhängig von der Prozessführung wurden 10 – 90 ml Probe davon eingesetzt. Die Gesamtkonzentration an Stickstoff im Medium setzte sich aus DIN (dissolved inorganic nitrogen) und DON (dissolved organic nitrogen) zusammen.

Die Bestimmung des gelösten anorganischen (DIN) und organischen (DON) Nitratgehaltes im Kulturmedium erfolgte nach Parsons (1984).

Wenn Nitrat in Seewasser durch eine mit Cadmium gefüllte und mit Kupfer beschichtete Säule läuft, wird es quantitativ zu Nitrit reduziert. Mit Sulfanilamid geht das produzierte Nitrit eine Diazoverbindung ein und wird dann an N-(1-naphtyl) Ethylendiamin gebunden. Es bildet sich ein Azo-Farbstoff, welcher spektrophotometrisch (UvikonXL, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, D) bei 542 nm gemessen werden kann. Die Probe wurde ab einer Konzentration von $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ verdünnt. Für die Auswertung der extrazellulären Stickstoffkonzentration (C_{Nextra}) wurden pro Reaktor und Tag aus zeitlichen und prozesstechnischen Gründen Einzelproben genommen.

2.4.3. Bestimmung der Phosphatkonzentration im Medium (DIP/DOP)

Nach den Probenahmen wurden die Mikroalgen durch Zentrifugation (*Kap. 2.3.5.*) vom Kulturmedium getrennt. Um das zu analysierende Medium zellfrei zu bekommen, wurde es anschließend noch durch einen Filter (GF/C, Ø 25 mm, Whatman, Brentfort, UK) gegeben. Abhängig von der Prozessführung wurden 10 – 90 ml Proben davon eingesetzt. Die Gesamtkonzentration an Phosphat im Medium setzte sich aus DIP (dissolved inorganic phosphorus) und DOP (dissolved organic phosphorus) zusammen.

Die Bestimmung des gelösten anorganischen (DIP) und organischen (DOP) Phosphatgehaltes im Kulturmedium erfolgte nach Hansen & Koroleff (1999).

Die Methode basiert auf der Reaktion von Phosphat-Ionen mit angesäuertem Ammoniummolybdat zu einer Phosphomolybdatsäure. Die Reaktion zu dieser heteropolaren Säure wird durch Kaliumantimontartrat unterstützt. Dabei werden Antimon-Ionen und Phosphat-Ionen im Verhältnis 1:1 in die Molybdatsäure eingebaut. Diese wird durch Ascorbinsäure reduziert und färbt sich blau. Die Konzentration von Phosphat wird bestimmt bei 882 nm im Spektrophotometer. Für die Auswertung der extrazellulären Phosphatkonzentration (C_{Pextra}) wurden pro Reaktor und Tag aus zeitlichen und prozesstechnischen Gründen Einzelproben genommen.

2.4.4. Bestimmung der totalen partikulären Phosphatkonzentration in der Zelle (TPPO₄³⁻)

Zur Bestimmung der totalen partikulären Phosphatkonzentration (TPPO₄³⁻) in der Zelle wurden 10 ml der Mikroalgensuspension über einen Filter (GF/C, Ø 25 mm, Whatman, Brentfort, UK) filtriert. Bis zur Analyse lagerten die Filter bei -20 °C.

Die Bestimmung des totalen partikulären Phosphates in der Zelle erfolgte nach van Beusekom & Brockmann (1998) und Hansen & Koroleff (1999, *Kap. 2.4.3.*). Für die Auswertung der intrazellulären Phosphatkonzentration (C_{Pintra}) wurden, pro Reaktor und Tag, aus zeitlichen Gründen Einzelproben genommen.

2.5. Bestimmung der Produktivität von Gesamtfettsäuren (TFA) und Eicosapentaensäure (EPA)

Die Produktivität bestimmter Stoffwechselprodukte, wie z.B. hier die Summe aller Fettsäuren (TFA) oder die Eicosapentaensäure (EPA), kann nach folgender Gleichung bestimmt werden

$$P = C \cdot \mu \quad (2.3.)$$

Dabei ist C die Produktkonzentration [mg L⁻¹] und μ die Wachstumsrate, ermittelt in einem Zeitintervall von 24 h [d⁻¹].

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse der Kultivierungen von *Nannochloropsis salina* bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium

Nannochloropsis salina (*N. salina*) wurde bei unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium untersucht, um zu überprüfen, inwiefern die Mikroalge Unterschiede hinsichtlich ihrer physiologischen (Fluoreszenzsignale, Wachstumsraten) und stoffwechselphysiologischen Aktivitäten (Fettsäure- und α -Tocopherolproduktion) bei 21 °C aufweist. Dass Stickstoff und Phosphat die Physiologie von Mikroalgen und speziell auch von *N. salina* beeinflussen, ist bekannt. Neu ist jedoch, den Effekt einzelner Umweltparameter während eines turbidostatischen Prozesses zu untersuchen. So konnte explizit die Reaktion der Mikroalge auf Nitrat- und Phosphatmangel sowie Temperatur herausgearbeitet werden. Andere Einflussgrößen wie z.B. Licht und pH werden konstant gehalten und sind so für alle Kulturen gleich. Dieses Vorgehen stellt sicher, dass die gemessenen Effekte durch die veränderten Parameter (Nitrat- und Phosphatlimitierungen, Temperatur) induziert wurden.

3.1.1. Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzsignale, der in den Photobioreaktoren kultivierten Mikroalgen, wurden mit zwei unterschiedlichen PAM-Messgeräten ermittelt. Beide Geräte haben, laut Herstellerangaben, unterschiedliche Einstellungen, z.B. Lichtintensitäten und Pulslänge (*Kap. 2.3.1.*). Der Einsatz beider Messgeräte diente der gegenseitigen Absicherung bzw. Unterstützung der erhobenen Fluoreszenzdaten. So ergaben die *online*-Messungen noch auswertbare Fluoreszenzsignale, bei denen die Signalverstärkung bei *inline*-Messungen nicht mehr ausreichte und der Detektor nicht sensitiv genug war für die eingehenden Messsignale. Aufgrund der eingesetzten Elektronik zur Anregung bzw. Bestimmung der Fluoreszenzsignale F und F_M' (Marxen et al. 2005) ist ein direkter Vergleich der Absolutwerte der Fluoreszenzintensitäten unangebracht. Alle F - und F_M' -Signale sind auf den jeweiligen zur Kultur gehörigen Startwert normiert worden (*Tab. 3.1.1., 3.1.2.*). Die Normierungen wurden vorgenommen, um Tendenzen erkennbar zu machen und um

Signalabweichungen zwischen den einzelnen PAM-Sonden (Kap. 2.1.2.1.) am Prozessbeginn zu korrigieren.

Tab. 3.1.1. Startwerte mit Standardabweichung der online gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' in [r.E.] zu Beginn des turbidostatischen Prozesses (*normiert siehe Text)

Kultur	F	F	F_M'	F_M'
N ₇₅	159 ± 4	} 175 ± 16	244 ± 1	} 239 ± 6
N ₁₅₀	158 ± 4		234 ± 5	
N ₃₀₀	191 ± 5		310 ± 0	
N ₆₀₀	191 ± 1		314 ± 1	
P ₆	245 ± 6	} 276 ± 37	552 ± 4	} 546 ± 21
P ₁₂	229 ± 1		512 ± 6	
P ₂₅	243 ± 3		569 ± 1	
P ₅₀	237 ± 2		550 ± 1	
REF	161 ± 4		350 ± 2	

Tab. 3.1.2. Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' in [r.E.] zu Beginn des turbidostatischen Prozesses (*normiert siehe Text)

Kultur	F	F	F_M'	F_M'
N ₇₅	0.111	} 0.16 ± 0.08	0.219	} 0.10 ± 0.02
N ₁₅₀	0.058		0.082	
N ₃₀₀	0.193		0.400	
N ₆₀₀	0.269		0.497	
P ₆	0.090	} 0.30 ± 0.16	0.310	} 0.30 ± 0.07
P ₁₂	0.089		0.226	
P ₂₅	0.128		0.414	
P ₅₀	0.110		0.247	
REF	0.103		0.215	

3.1.1.1. Online-Fluoreszenzsignale

Die Fluoreszenzparameter F und F_M' wurden durch direktes Messen am Reaktor mit Hilfe des Mini-PAM-Gerätes ermittelt (Kap. 2.3.1.1.).

Die Zeitverläufe der Fluoreszenzsignale F und F_M' der Referenzkultur (Vollmedium) und die nach Gleichung 2.1. (Kap. 2.3.1.1.) ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII} der Referenzkultur sind in Abb. 3.1.1. dargestellt.

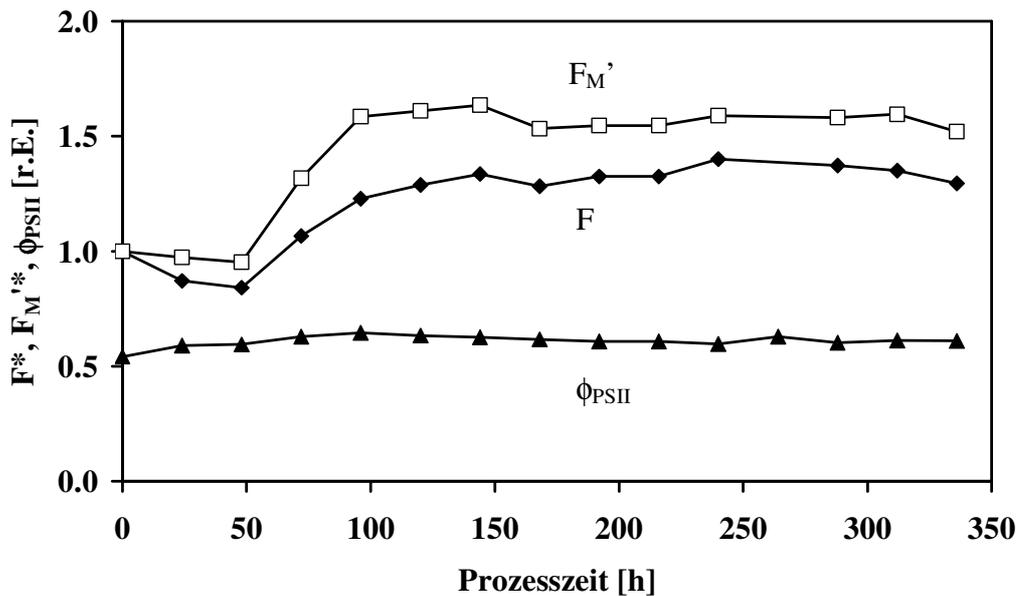


Abb. 3.1.1. Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' (* normiert) und der daraus ermittelten photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} der Referenzkultur (REF, $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21°

Die Fluoreszenzsignale F , F_M' der Nitrat- und Phosphatexperimente sind in Abb. 3.1.2. und 3.1.3. und die daraus berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} in Abb. 3.1.4. abgebildet.

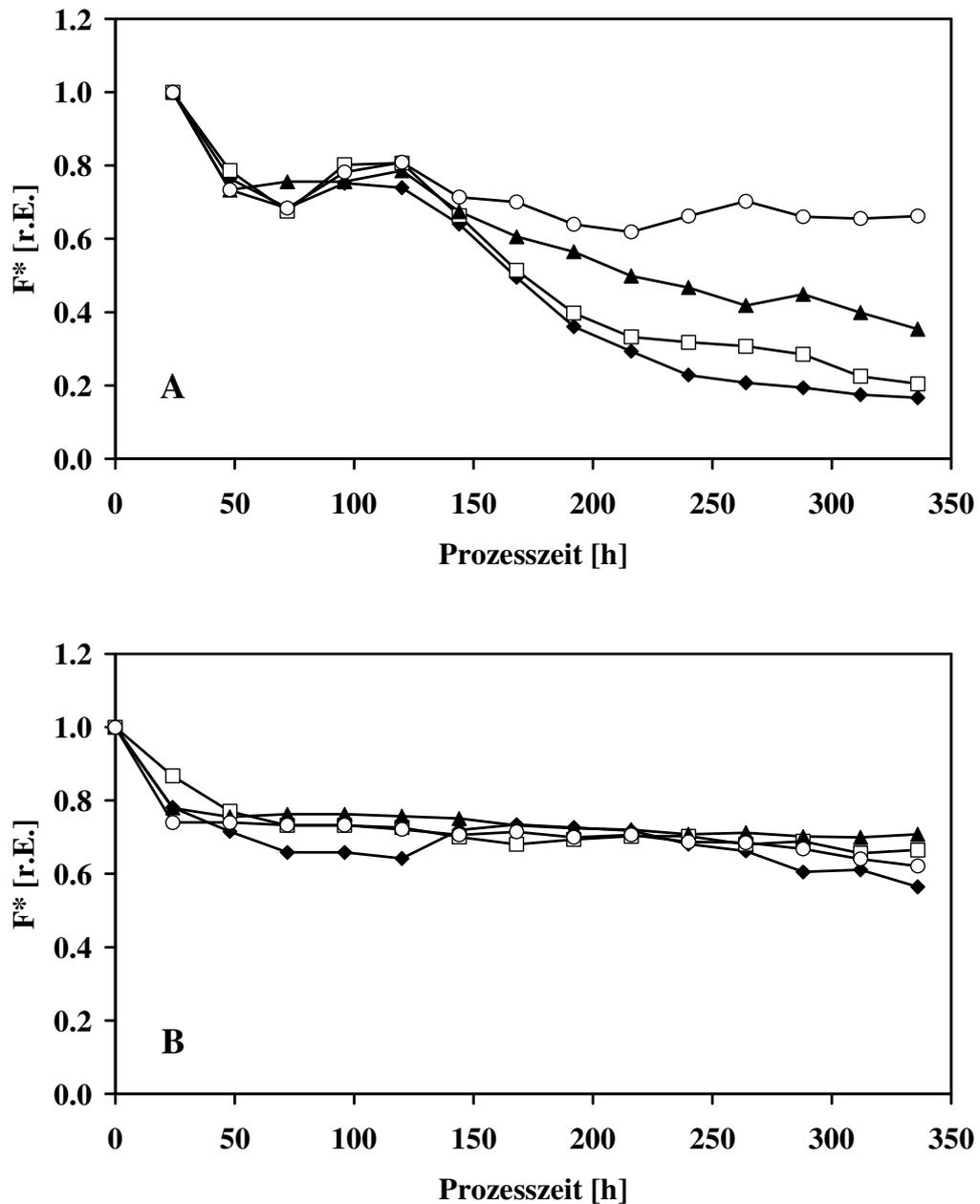


Abb. 3.1.2. Zeitlicher Verlauf des online gemessenen Fluoreszenzsignals F (*normiert) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50

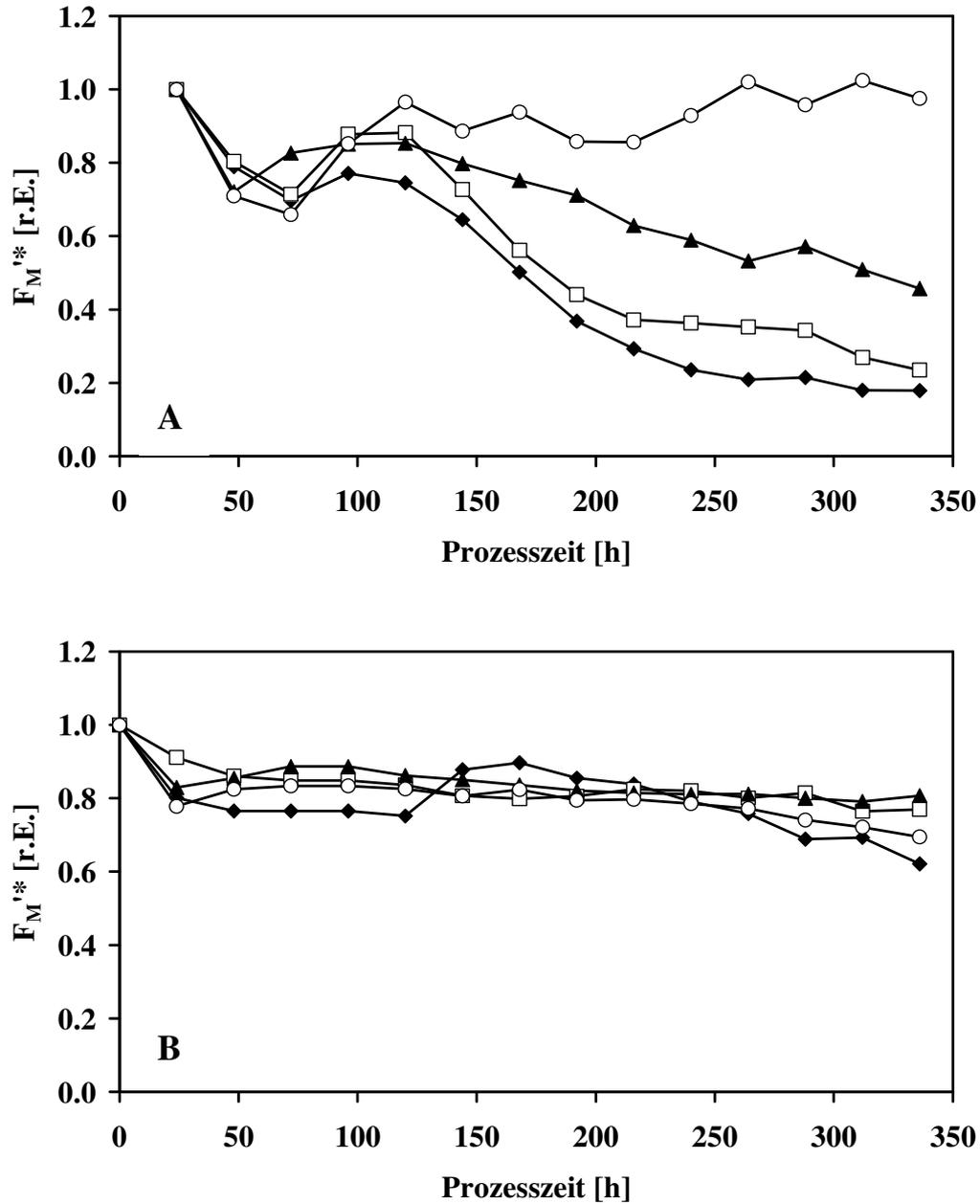


Abb. 3.1.3. Zeitlicher Verlauf des online gemessenen Fluoreszenzsignals F_M' (*normiert) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50

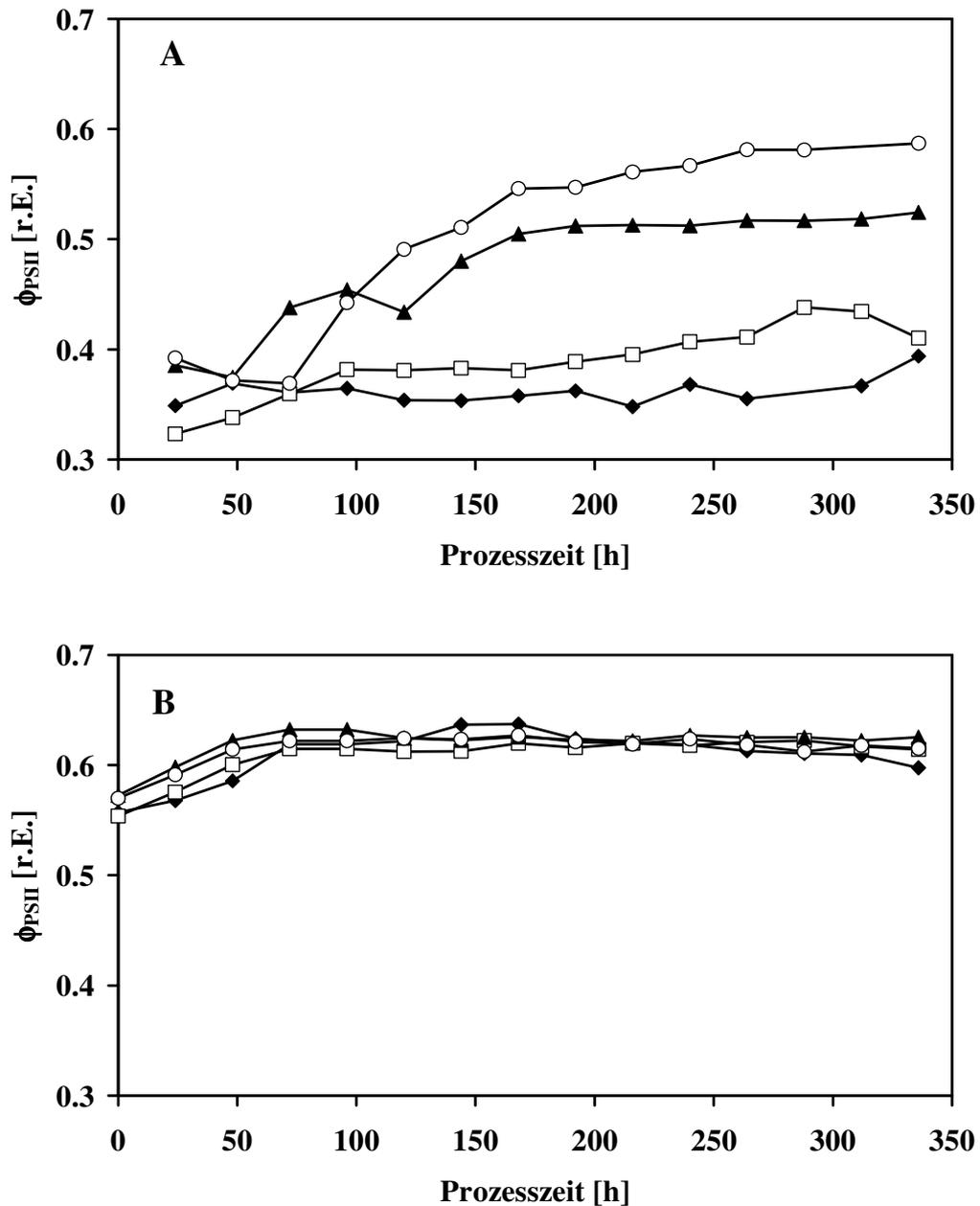


Abb. 3.1.4. Zeitlicher Verlauf der photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} , ermittelt aus den online gemessenen Fluoreszenzsignalen F und F_M' (Abb. 3.1.2., 3.1.3.) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirren: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirren (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50

Der Verlauf von F und F_M' von *N. salina* in den Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot, einschließlich der Referenzkultur (Abb. 3.1.1., 3.1.2. A, 3.1.3. A), wies auf einen Adaptionsprozess in den ersten 120 h hin. Nach einem Absinken der F und F_M' -Signale

um 20 – 30 % bis 50 - 75 h nach Prozessbeginn stiegen die Fluoreszenzsignale wieder an und erreichten bei 120 h ihr Maximum. Anschließend fielen die Signale bis zum Prozessende erneut ab. Dies trifft nicht auf die F- und F_M' -Signale der Referenzkultur (Abb. 3.1.1.) und F_M' der Kultur N_{600} (Abb. 3.1.3. A) zu, die die Signalstärke nach der Anpassungsphase beibehielten, und die Signale bis zum Prozessende stationär verliefen.

Die Abnahme der F- und F_M' -Signale um 20 % war auch bei den Phosphatexperimenten (Abb. 3.1.2. B, 3.1.3. B), bis zu einer Prozesszeit von 50 h, zu beobachten. Anschließend verhielten sich die Signale bis zum Prozessende konstant. Dabei blieben die unterschiedlichen Phosphatlimitierungen ohne Wirkung auf die Fluoreszenzsignale. Folglich resultierten, aus den nahezu einheitlichen Signalen von F und F_M' der phosphatlimitierten Kulturen, übereinstimmende Ergebnisse mit $\phi_{PSII} = 0.6$ r.E. (Abb. 3.1.4. B). Gleichfalls entsprach dieser Wert dem ϕ_{PSII} -Wert der Referenz (Abb. 3.1.1.).

Der Einfluss unterschiedlicher Nitratkonzentrationen auf die Zeitverläufe der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} der Nitratexperimente (Abb. 3.1.4. A) zeigte Folgendes: Nach Prozessbeginn stiegen nur die ϕ_{PSII} -Werte der Kulturen N_{300} und N_{600} auf 0.5 und 0.58 r.E. deutlich an. Die Kulturen N_{75} und N_{150} lagen nach 350 h in einem Bereich von 0.3 bis 0.4 r.E. und damit in dem Wertebereich wie zum Prozessbeginn. Die divergenten Ergebnisse der nitratlimitierten Kulturen der photochemischen Effizienz zum Prozessende spiegeln die unterschiedlichen Nitratzugaben während der Kultivierung wider. Übereinstimmende ϕ_{PSII} -Werte, ungeachtet der Nitratkonzentration, ergaben sich nach 350 h zwischen der Referenzkultur (REF) und der Kultur N_{600} .

3.1.1.2. *Inline*-Fluoreszenzsignale

Die *inline* gemessenen Fluoreszenzsignale der Referenzkultur F und F_M' und die nach Gleichung 2.1. (Kap. 2.3.1.1.) berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} , sind in Abb. 3.1.5. über die Zeit dargestellt.

Die *inline* gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' der Nitrat- und Phosphatexperimente und sind in den Abb. 3.1.6. und 3.1.7. und ihre photochemische Effizienz ϕ_{PSII} in Abb. 3.1.8. dargestellt.

Sowohl F- als auch F_M' -Signale der *N. salina*-Kulturen der Nitratexperimente (Abb. 3.1.6. A, 3.1.7. A) sowie der Referenz (Abb. 3.1.5.), zeigten eine Anfangsdynamik, die geprägt war durch einen Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensitäten um 30 – 70 % in den ersten 50 – 75

h der Prozesse. Dabei sanken die F - und F_M' -Signale der Kulturen N_{75} , N_{300} und N_{600} im Vergleich zu den Signalen der Referenz um mehr als das 2-fache. Anschließend war ein Wiederanstieg der Intensitäten zu beobachten, der nach 100 bis 120 h der Prozesszeit ein Maximum in allen Versuchen erreicht. Der prinzipielle Verlauf der Kultur N_{150} entspricht dem Verlauf der oben beschriebenen nitratlimitierten Kulturen. Die hohen Normierungswerte der Fluoreszenzsignale in Kultur N_{150} können auf die Messtechnik zurückgeführt werden und spiegeln vermutlich nicht die tatsächlichen Intensitäten wider.

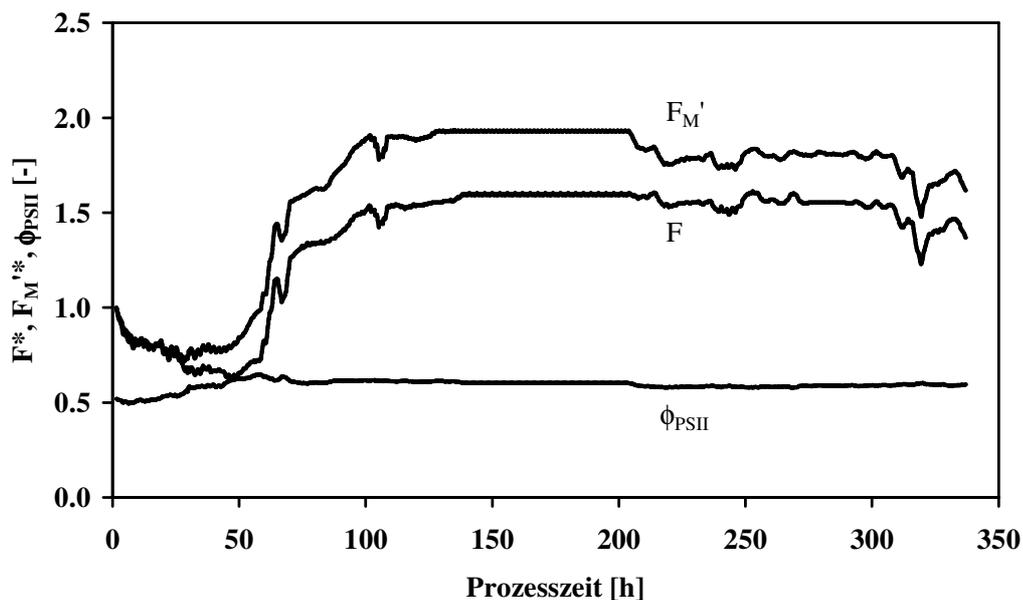


Abb. 3.1.5. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' (* normiert) der Referenzkultur (REF, $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) und der daraus ermittelten photosynthetischen Effizienz ϕ_{PSII} von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C.

Die Referenzkultur und die Kultur N_{600} hielten ihre F und F_M' -Signale mit 1.5 r.E und 2.0 r.E (Abb. 3.1.5.) und mit 0.4 r.E. (Abb. 3.1.6. A, 3.1.7. A) bis zum Prozessende konstant. Dagegen fielen die Fluoreszenzsignale der Kulturen N_{75} , N_{150} und N_{300} (Abb. 3.1.6. A, 3.1.7. A) bis zum Ende ab.

Die zeitliche Verläufe der Fluoreszenzsignale F und F_M' der Kulturen der Phosphatexperimente (Abb. 3.1.6. B, 3.1.7. B) waren weniger ausgeprägt in ihrer Dynamik als in den Kulturen der Nitratexperimente (Abb. 3.1.6. A, 3.1.7. A) und der Referenzkultur (Abb. 3.1.5.). Im Anschluss an die Anpassungsphase (50 – 75 h) fanden keine Erholungsvorgänge

bzw. ein Wiederanstieg der Fluoreszenzsignale statt. F und F_M' verhielten sich in den Phosphatkulturen, wie die Referenz, stationär bis zum Prozessende. Nach 350 h lagen die F -Werte mit 0.4 – 0.8 r.E. (Abb. 3.1.6. B) und die F_M' -Werte mit 0.4 – 0.9 r.E. (Abb. 3.1.7. B), deutlich unter denen der Referenz (s.o.), jedoch über denen der Nitratexperimente.

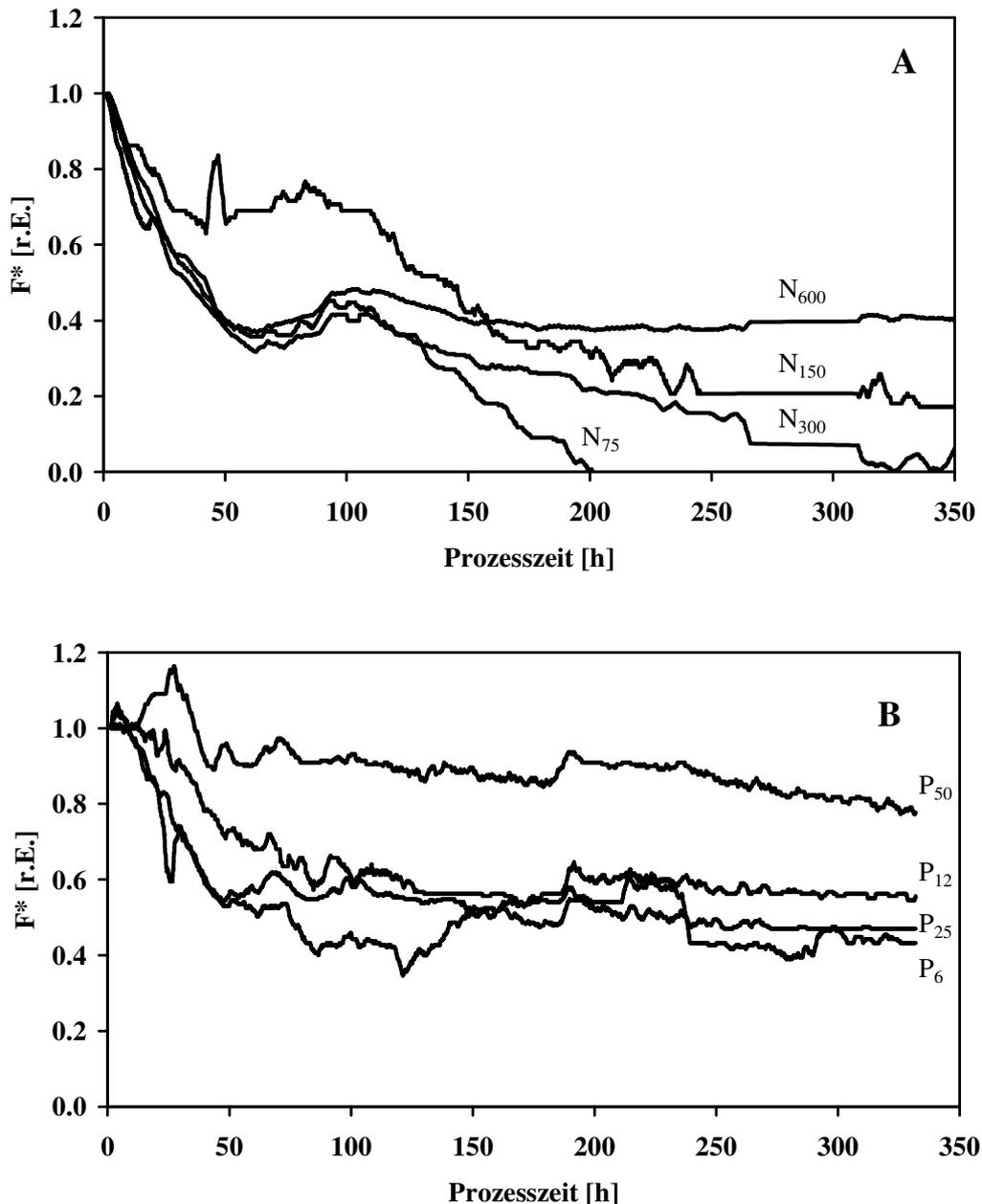


Abb. 3.1.6. Zeitlicher Verlauf des inline gemessenen Fluoreszenzsignals F (*normiert) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen in den Medienreservoirs: N_{75} ; N_{150} ; N_{300} ; N_{600} , (B) Variierende Phosphatkonzentrationen in den Medienreservoirs P_6 ; P_{12} ; P_{25} ; P_{50}

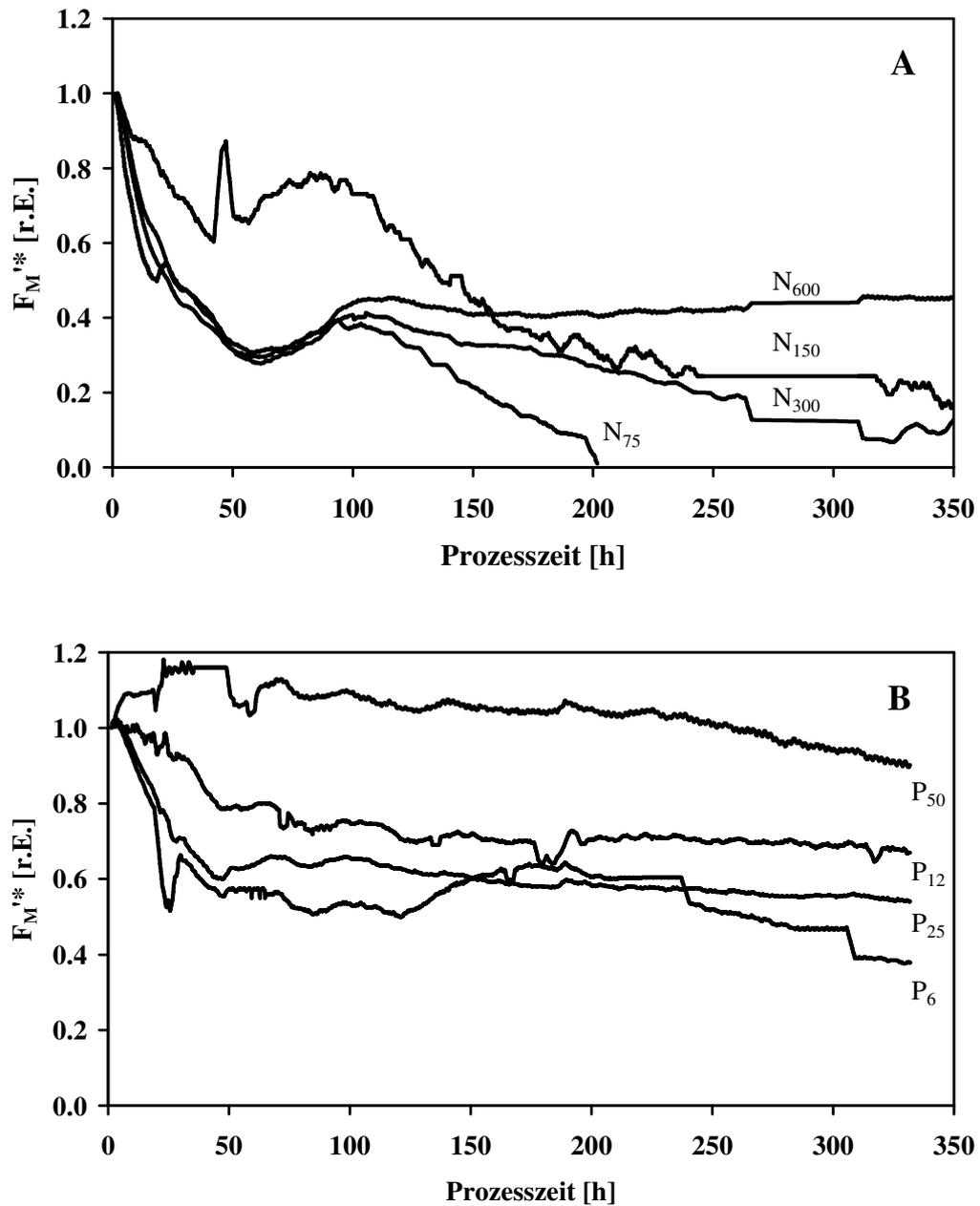


Abb. 3.1.7. Zeitlicher Verlauf des inline gemessenen Fluoreszenzsignals F_M' (*normiert) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen in den Medienreservoirien: N_{75} ; N_{150} ; N_{300} ; N_{600} , (B) Variierende Phosphatkonzentrationen in den Medienreservoirien P_6 ; P_{12} ; P_{25} ; P_{50}

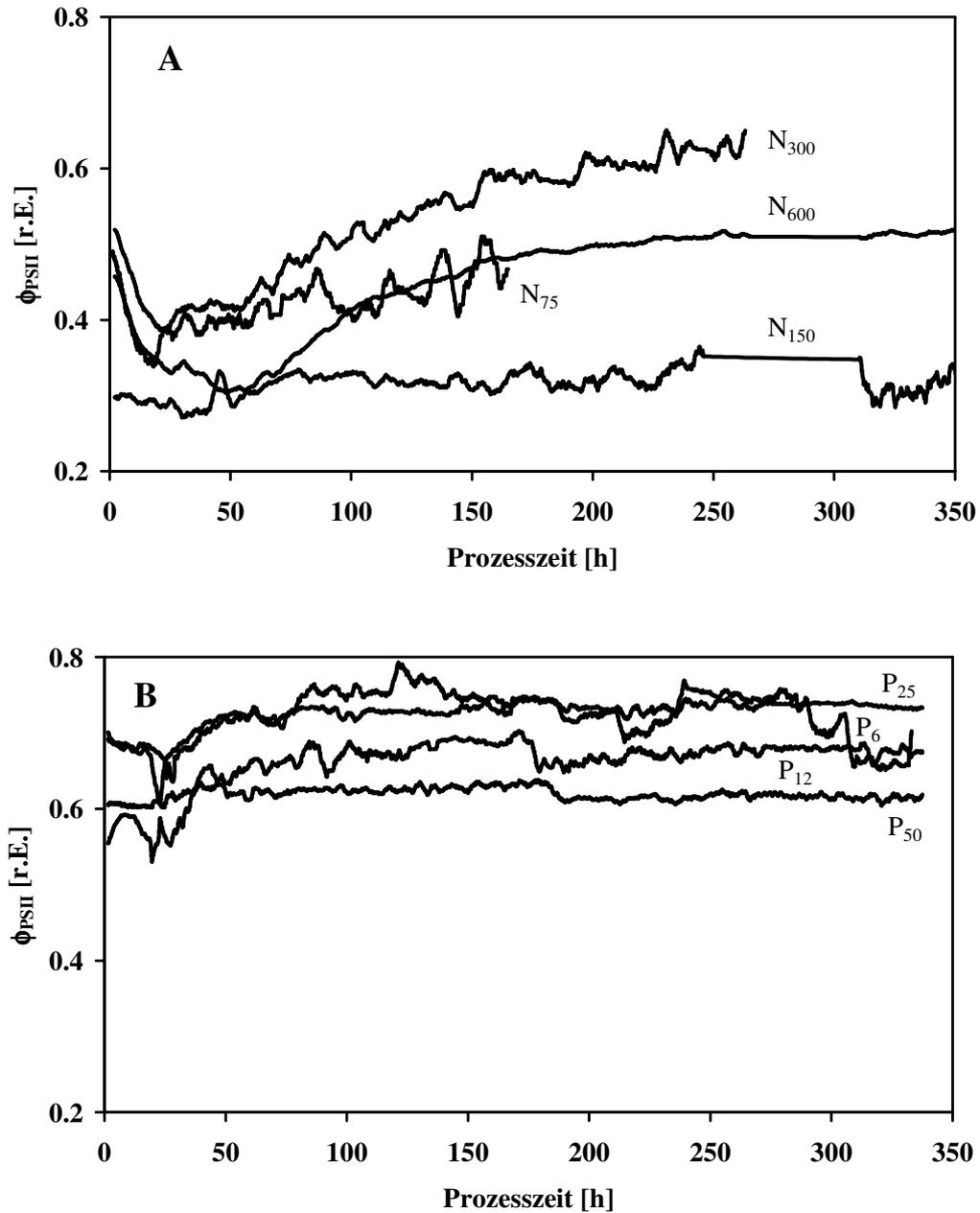


Abb. 3.1.8. Zeitlicher Verlauf der aus inline-Fluoreszenzsignalen (Abb. 3.1.6., 3.1.7.) ermittelten photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. A) Variierende Nitratkonzentrationen in den Medienreservoirien: N_{75} ; N_{150} ; N_{300} ; N_{600} , (B) Variierende Phosphatkonzentrationen in den Medienreservoirien P_6 ; P_{12} ; P_{25} ; P_{50}

Die in turbidostatischen Prozessen mit unterschiedlicher Nitratkonzentrationen durchgeführten Versuche unterschieden sich deutlich hinsichtlich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F , F_M') bzw. deren zeitlichem Verlauf im Vergleich zu den

Fluoreszenzerggebnissen der turbidostatischen Versuche bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen.

Die zeitlichen Verläufe der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} der Nitratkulturen sind in *Abb. 3.1.8. A* gezeigt. Innerhalb der ersten 24 h des Prozesses sanken die ϕ_{PSII} -Werte in N_{75} , N_{300} und N_{600} von 0.55 r.E. auf 0.35 – 0.4 r.E. ab. Danach stieg in den Kulturen N_{75} und N_{300} der ϕ_{PSII} -Wert auffällig. Im Falle der stärksten Nitratreduzierung (N_{75}) sind nach 150 - 200 h keine aussagekräftigen Fluoreszenzsignale mehr detektierbar und somit keine sinnvolle Genty-Berechnung (*Abb. 3.1.8. A*) mehr möglich. Werden die *online* ermittelten ϕ_{PSII} -Werte (*Kap. 3.1.1.1., Abb. 3.1.4. A*) zum Vergleich herangezogen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in Kultur N_{75} und N_{300} aufgrund der niedrigen F- und F_M' -*inline*-Signale (*Abb. 3.1.6. A, 3.1.7. A*) um eine fehlerhafte ϕ_{PSII} -Berechnung handelt. Der Verlauf der photochemischen Effizienz in Kultur N_{150} (*Abb. 3.1.8. A*) zeigte über den gesamten Prozesszeitraum hinweg konstante ϕ_{PSII} -Werte. Lediglich in der Kultur N_{600} (*Abb. 3.1.8. A*) war im zeitlichen Verlauf eine ausgeprägte Anpassungsphase, mit einem Minimum bei 50 h und einem Maximum bei 150 h, zu sehen. Die Referenzkultur dagegen (*Abb. 3.1.5.*) zeigte in ihrem gesamten Zeitverlauf konstante ϕ_{PSII} -Werte. Bei diesen beiden Kulturexperimenten (N_{600} , REF) konnten am Prozessende mit $\phi_{\text{PSII}} = 0.55$ r.E. bzw. 0.6 annähernd gleiche Werte berechnet werden.

Der zeitliche Verlauf von ϕ_{PSII} der Phosphatexperimente (*Abb. 3.1.8. B*) folgte dem stationären Verlauf der Referenzkultur. Nach 350 h lagen die ϕ_{PSII} -Werte der phosphatlimitierten Kulturen in einem Bereich von 0.6 bis 0.75 r.E. und damit oberhalb der Werte der Referenzkultur.

3.1.2. Biologische Trockenmasse (BTM)

Die biologische Trockenmasse (BTM) wurde entsprechend vorliegendem Protokoll (*Kap. 2.3.3.*) bestimmt. Alle gemessenen Konzentrationen an Fettsäuren, Pigmenten, *a*-Tocopherol und Nährstoffen wurden auf die BTM bezogen.

Die *Abb. 3.1.9.* zeigt BTM-Messungen von jeweils vier Versuchen mit unterschiedlichem Nitrat- (N_{75} , N_{150} , N_{300} , N_{600}) bzw. Phosphatangebot (P_6 , P_{12} , P_{25} , P_{50}) im Medium.

Da in einem turbidostatischen Prozess die Optische Dicht (OD) konstant gehalten wird, zeigen die beiden *Abb. 3.1.9. A* und *B* folglich keine Tendenz beim Verlauf der BTM.

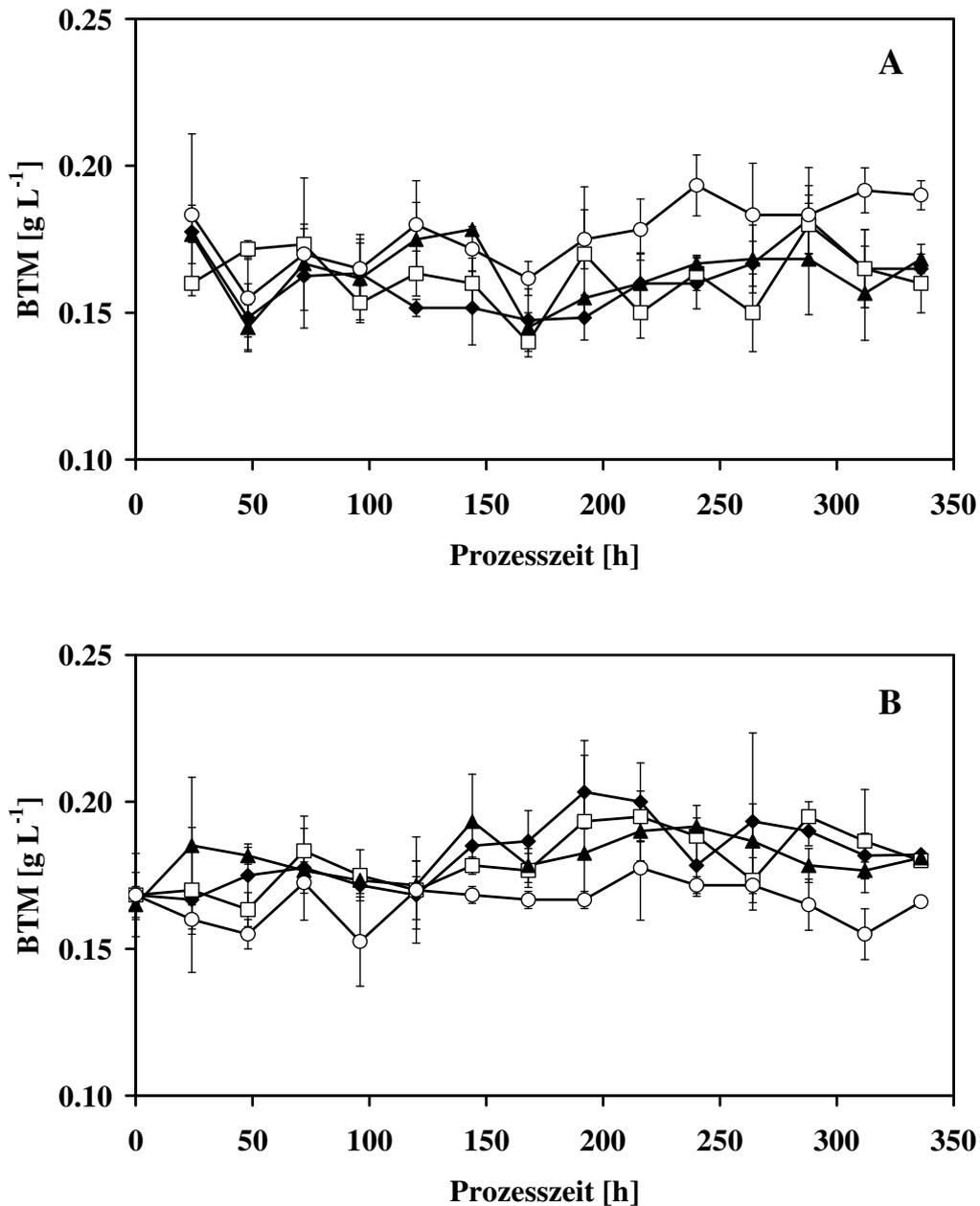


Abb. 3.1.9. Zeitlicher Verlauf der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (\blacklozenge) 75; (\square) 150; (\blacktriangle) 300; (\circ) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (\blacklozenge) 6; (\square) 12; (\blacktriangle) 25; (\circ) 50

Es kann festgestellt werden, dass es bei keinem Experiment signifikante Änderungen der BTM über den gesamten Prozesszeitraum gab.

In Tab. 3.1.3. sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche bei 21 °C aufgelistet.

Tab. 3.1.3. Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte ($3 d^{-1}$) und Standardabweichungen der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten.

Kultur	NO₃²⁻ [μmol L⁻¹]	PO₄³⁻ [μmol L⁻¹]	BTM [g L⁻¹]
N ₇₅	75	90	0.16 ± 0.01
N ₁₅₀	150	90	0.16 ± 0.01
N ₃₀₀	300	90	0.16 ± 0.01
N ₆₀₀	600	90	0.18 ± 0.01
P ₆	1800	6	0.18 ± 0.01
P ₁₂	1800	12	0.18 ± 0.01
P ₂₅	1800	25	0.18 ± 0.01
P ₅₀	1800	50	0.17 ± 0.01
REF	1800	90	0.21 ± 0.03
Mittelwert			0.18 ± 0.02
Abweichung [%]			8.9

Die Abweichungen der BTM-Werte liegen innerhalb eines Kulturexperimentes bei 6.0 bis 7.5 % (Abb. 3.1.9. A) und 4.3 bis 6.2 % (Abb. 3.1.9. B). Die Kulturen wurden bei niedrigen Biomassekonzentrationen (0.16 – 0.21 g BTM L⁻¹) gehalten, um ein konstantes Zelle/ PAR (photosynthetically active radiation) –Verhältnis zu erhalten.

3.1.3. Wachstumsrate (μ)

In einem turbidostatischen Prozess wird die BTM konstant gehalten. Die Mikroalge *N. salina* wächst jedoch kontinuierlich weiter und um die BTM konstant zu halten, wird je nach Wachstumsrate (μ) Frischmedium aus den Reservoiren in die Reaktoren gepumpt. Parallel fließt das gleiche Volumen passiv über den Überlauf ab. Anhand des Pumpvolumens bzw. Überlaufvolumens wurden alle 24 h die Wachstumsraten ermittelt.

In Abb. 3.1.10. sind die Verläufe der Wachstumsraten (μ) der Versuche bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten dargestellt. Die Prozessdauer erstreckte sich über einen Zeitraum von 350 h.

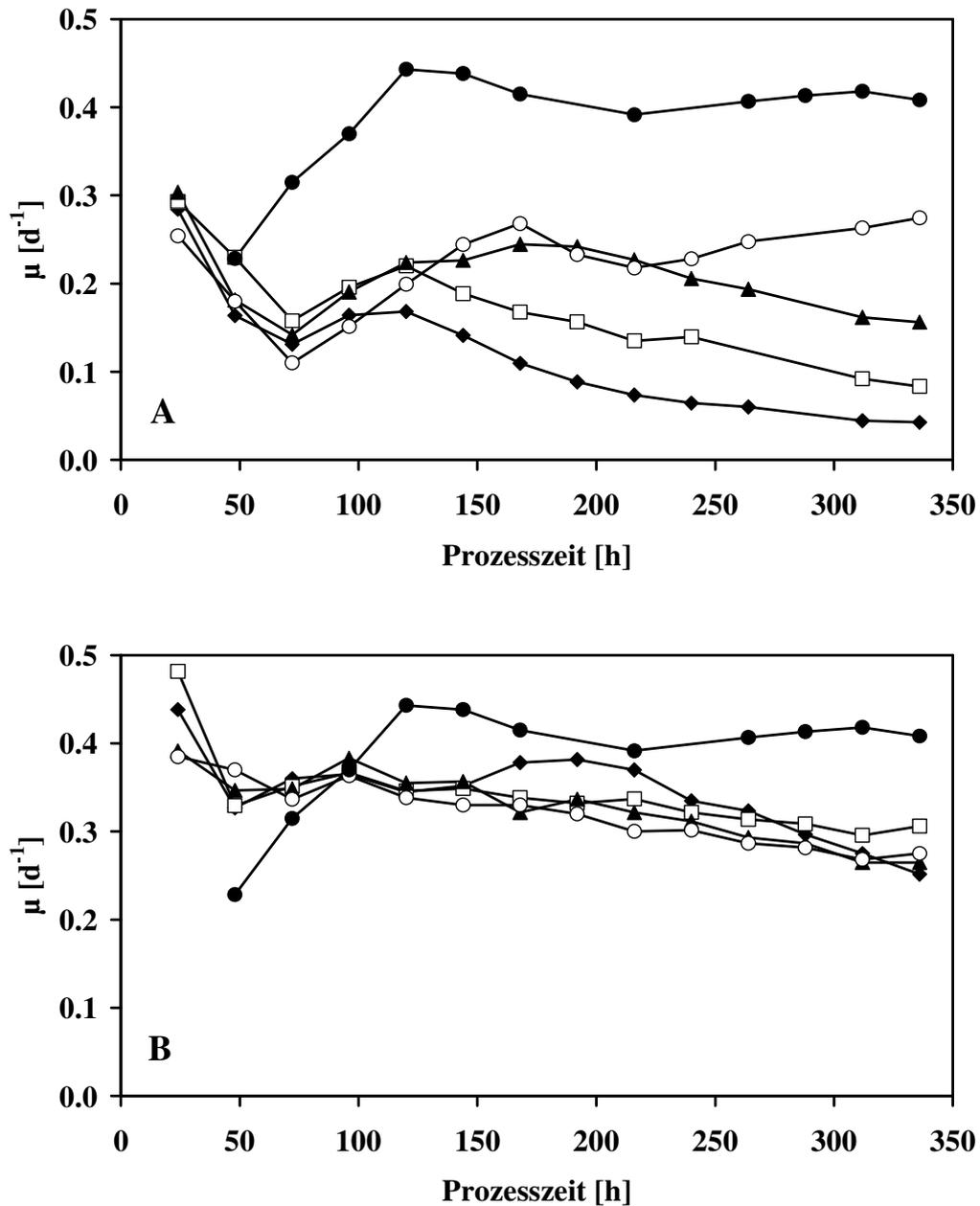


Abb. 3.1.10. Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten (μ) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen (μ mol NO₃²⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien: (♦) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen (μ mol PO₄³⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien (♦) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50, Referenz(●) 1800 μ mol NO₃²⁻ L⁻¹ und 90 μ mol PO₄³⁻ L⁻¹

N. salina wurde im „batch“-Verfahren (Kap. 2.1.1.) in einer Starterkultur vorkultiviert, um die Reaktoren für nachfolgende Versuche zu bestücken. Im Reaktor musste sich die Mikroalge dann auf neue Wachstumsparameter, wie z.B. Licht- und Nährstoffangebot, Temperatur und pH-Wert umstellen. Dieser Prozess, den die Mikroalgen durchliefen, war gekennzeichnet durch eine Anpassungsphase.

In Abb. 3.1.10. A gestaltete sich die Anpassungsphase der nitratlimitierten Kulturen nahezu gleich. In den ersten 72 h fiel die Wachstumsrate auf einen durchschnittlichen Wert von $\mu = 0.14 (\pm 0.02) \text{ d}^{-1}$ und in den anschließenden 48 h ($t = 120 \text{ h}$) erholte sich μ wieder. Nach der Anpassungsphase sank die Wachstumsrate der Kulturen N_{75} und N_{150} stetig bis zum Prozessende ab, während die Wachstumsrate der Kulturen N_{300} und N_{600} weiterhin zunahm. Nach 220 h nahm auch die Kultur N_{300} bis zum Prozessende hin ab.

In der Referenzkultur stieg die Wachstumsrate bereits 48 h nach Prozessbeginn, also 24 h vor den nitratlimitierten Kulturen, und erreichte nach 120 h ihren in diesem Verlauf maximalen Wert, von 0.44 d^{-1} . Der Endwert der Wachstumsrate der Referenzkultur betrug 0.41 d^{-1} .

Die größte Abweichung ergab sich mit einer Differenz von 90 % zwischen der Kultur mit Vollmedium (REF) und der Kultur mit der geringsten Nitratverfügbarkeit (N_{75}). Wachstumsraten der Kulturen mit höheren Nitratangeboten (N_{150} , N_{300} , N_{600}) verringerten sich gegen über den Werten der Wachstumsrate der Referenz um 80, 63 bzw. 34 % (Tab. 3.4.1).

Der Verlauf der Wachstumsraten der Kulturen mit abweichenden Phosphatangeboten (Abb. 3.1.10. B) ergab ein anderes Bild. Hier fiel die Anpassungsphase wesentlich kürzer aus im Vergleich zu nitratlimitierten Kulturen (Abb. 3.1.10. A). In den ersten 48 h fielen die Wachstumsraten ab und nach 48 bis 72 h stiegen sie wieder an. Anschließend verliefen die Wachstumsraten der phosphatlimitierten Kulturen mit einer schwach abnehmenden Tendenz bis zum Prozessende. Dabei wiesen diese Kulturen nur minimale Unterschiede auf.

Ein wesentlicher Unterschied zu nitratlimitierten Kulturen waren jedoch die in einem engen Bereich liegenden Werte am Prozessende. Bei einem Mittelwert von $\mu = 0.28 (\pm 0.02)$ (Tab. 3.1.4.) zeigten sie untereinander eine prozentuale Abweichung von 5.3 % auf. Bezug nehmend auf das Vollmedium (REF), wichen die Wachstumsraten die Kulturen P_6 , P_{12} , P_{25} und P_{50} um durchschnittlich 32 % nach unten ab (Abb. 3.1.10. B). Damit lagen die phosphatlimitierten Kulturen im gleichen Wertebereich wie die Kultur N_{600} (Abb. 3.1.10. A).

Tab. 3.1.4. Wachstumsraten von *N. salina* Kulturen nach 350 h unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μmol L ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [μmol L ⁻¹]	μ [d ⁻¹]
N ₇₅	75	90	0.040
N ₁₅₀	150	90	0.081
N ₃₀₀	300	90	0.153
N ₆₀₀	600	90	0.269
P ₆	1800	6	0.274
P ₁₂	1800	12	0.304
P ₂₅	1800	25	0.272
P ₅₀	1800	50	0.275
REF	1800	90	0.413

3.1.4. Pigmente

Die Pigmentanalyse wurde wie in *Kap. 2.3.6.* beschrieben durchgeführt. Daraus resultierende Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in mg g⁻¹ angegeben. Die Prozessdauer erstreckte sich über einen Zeitraum von 350 h.

3.1.4.1. Chlorophyll_a (Chl_a)

In *Abb. 3.1.11.* sind die zeitlichen Verläufe der Chl_a-Konzentrationen pro BTM der Versuche bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten dargestellt.

Die nitratlimitierten Kulturen (*Abb. 3.1.11. A*) verzeichneten innerhalb der ersten 96 h (N₆₀₀) bzw. 120 h einen Abfall von Chl_a. In der nachfolgenden Prozesszeit nahm Chl_a in Kultur N₇₅ weiter bis zum Prozessende ab, ohne vorher eine zunehmende Tendenz zu haben wie Chl_a der Kulturen N₁₅₀ und N₃₀₀. In diesen sank Chl_a erst nach einer Anpassung zum Prozessende hin ab. Die Kultur N₆₀₀ zeigte stationäre Chl_a-Konzentrationen nach der

Anpassungsphase. Die Chl_a-Konzentration der Referenzkultur blieb während des gesamten Prozesszeitraumes über konstant.

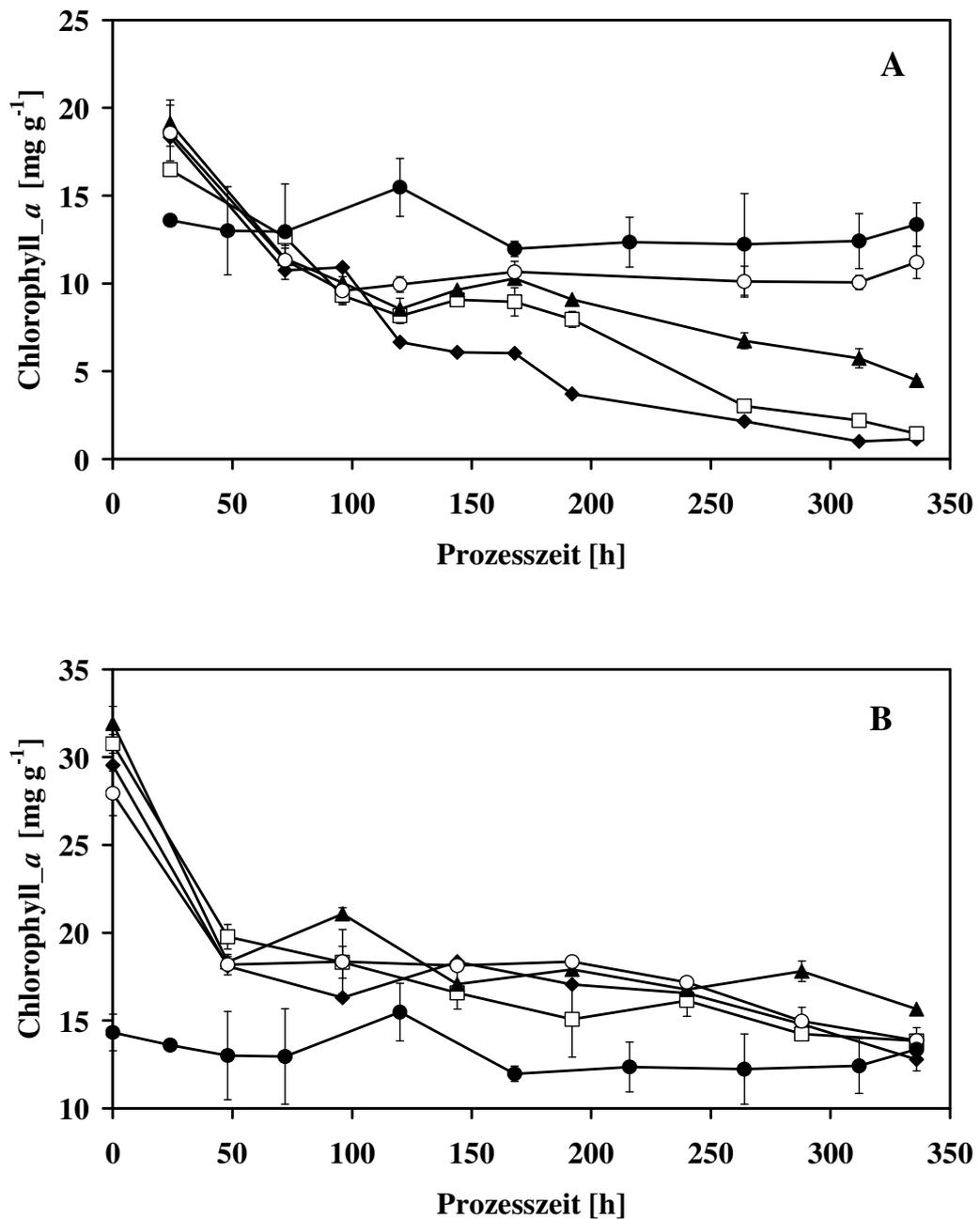


Abb. 3.1.11. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene Chl_a-Konzentration [mg g⁻¹] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen (μmol NO₃²⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen (μmol PO₄³⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 μmol NO₃²⁻ L⁻¹ und 90 μmol PO₄³⁻ L⁻¹

Am Ende des Versuchszeitraums gab es eine maximale Abweichung zwischen den Chl_a-Konzentrationen der Referenzkultur und der Kultur mit der geringsten Nitratverfügbarkeit (N₇₅) von 96 %. Die Chl_a-Konzentration der verbleibenden nitratlimitierten Kulturen (N₁₅₀, N₃₀₀, N₆₀₀) verringerten sich bis zum Ende des Prozesses nach 350 h gegenüber der Referenzkultur um 89, 67 bzw. 14 %.

Ganz anders verhielten sich die Chl_a-Konzentrationen der Kulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot. Die Anpassungsphase war hier bereits nach 48 h abgeschlossen. In dieser Phase nahm die Chl_a-Konzentration bei allen phosphatlimitierten Kulturen (P₆-P₅₀) von ca. 30 mg [g BTM]⁻¹ auf ca. 20 mg [g BTM]⁻¹ stark ab. Einen weiteren Unterschied zu nitratlimitierten Kulturen stellten die sich stark annähernden Chl_a-Gehalte der unterschiedlichen Phosphatkulturen am Prozessende dar (*Tab. 3.1.5.*). Einschließlich der Referenzkultur betrug der Mittelwert der Chl_a-Konzentrationen 14.4 mg [g BTM]⁻¹. Die prozentuale Abweichung lag dabei unter 10 %. Somit hatten unterschiedliche Phosphatangebote bei *N. salina* keinen Einfluss auf die Chl_a-Konzentration bei 21 °C.

3.1.4.2. Violaxanthin (Vx)

In *Abb. 3.1.12.* sind die zeitlichen Verläufe der Violaxanthin (Vx)-Konzentrationen der Versuche bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten dargestellt.

Die zeitlichen Verläufe von Vx in nitrat- und phosphatlimitierten Kulturen sowie der Verlauf der Konzentration von Vx der Referenzkultur (*Abb. 3.1.12. A* bzw. *B*) zeigten ähnliche Entwicklungen wie die von Chl_a (*Kap. 3.1.4.1.*). Die Anpassungsphase der nitratlimitierten Kulturen lief über einen Zeitraum von 96 h (N₆₀₀) bzw. 120 h (N₇₅, N₁₅₀, N₃₀₀) und war gekennzeichnet durch ein starkes Absinken der Vx-Konzentrationen. Die Vx-Konzentration der Kultur N₆₀₀ zeigte sich in den nächsten 168 h konstant und sank nach 270 h zum Prozessende hin ab.

Nach der Anpassungsphase hielten die Kulturen N₁₅₀ und N₃₀₀ zunächst die Konzentration an Vx konstant und nahmen nach 200 h bis zum Prozessende kontinuierlich ab. Weder eine Anpassungsphase noch eine Tendenz zeigte Vx in der Referenzkultur. Die Werte blieben nahezu konstant über den gesamten Prozesszeitraum. Die Konzentration von Vx in den Kulturen mit geringsten Nitratangeboten (N₇₅, N₁₅₀) zeigte eine Abnahme zum Vollmedium um 90 bis 95 %.

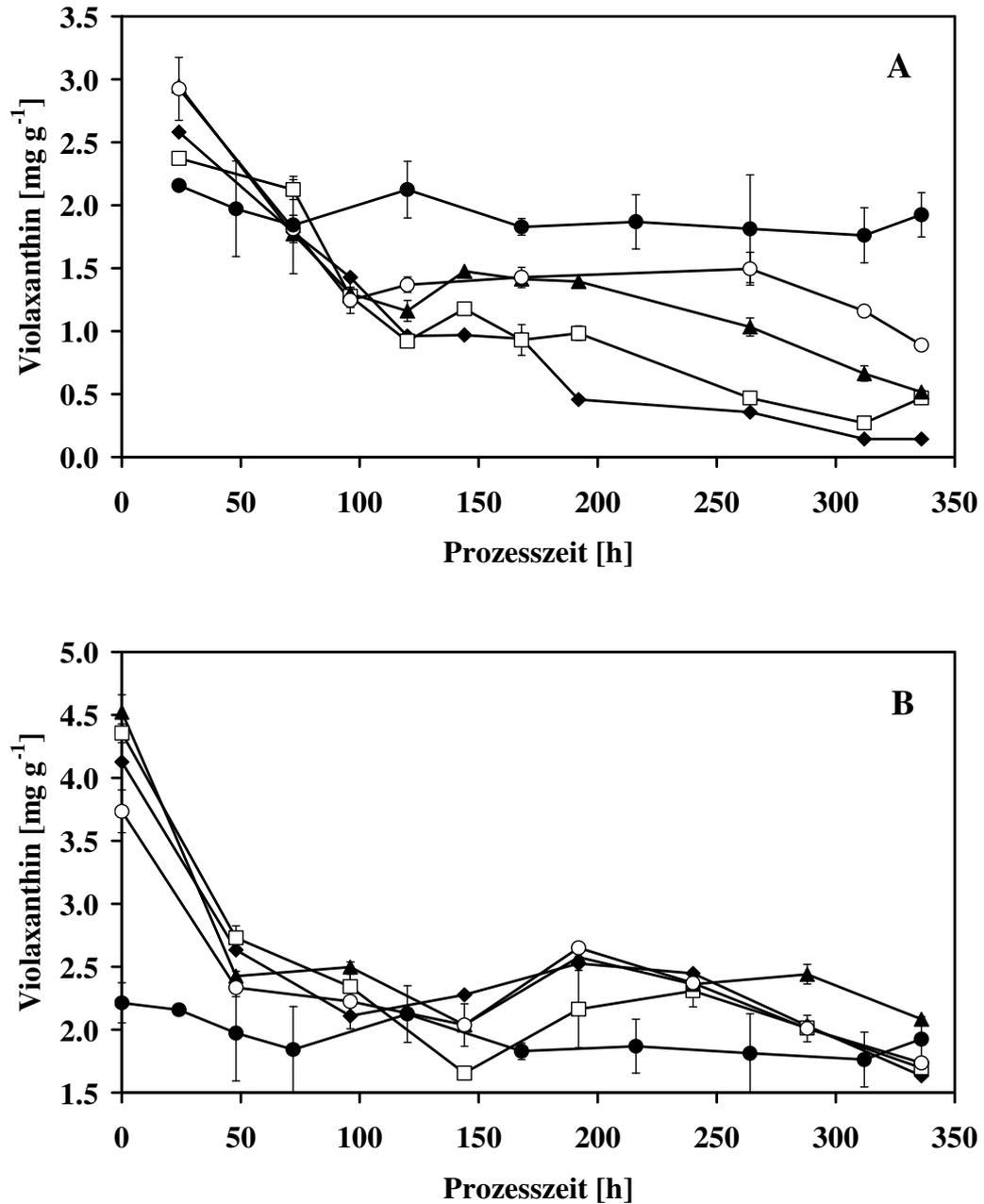


Abb. 3.1.12. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene Violaxanthinkonzentration [mg g⁻¹] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen (µmol NO₃²⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen (µmol PO₄³⁻ L⁻¹) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 µmol NO₃²⁻ L⁻¹ und 90 µmol PO₄³⁻ L⁻¹

Aus höheren Nitratangeboten (N₃₀₀, N₆₀₀) resultierte eine Konzentration an V_x, die um 70 und 55 % niedriger war, als die der Referenzkultur (Tab. 3.1.5.).

In der *Abb. 3.1.12. B* zeigt der zeitliche Verlauf der V_x-Konzentration bei phosphatlimitierten Kulturen eine Anpassungsphase von 48 h; diese war im Vergleich zu den V_x-Werten der nitratlimitierten Kulturen kürzer. Nach einem geringen Abwärtstrend erholten sich die V_x-Konzentrationen wieder und sanken dann zum Prozessende hin ab. Die Werte von V_x der Kulturen mit unterschiedlichen Phosphatangeboten zeigten, dass sich Phosphat nicht als Einflussgröße darstellte. Ein Effekt wie bei *Chl_a*. Die V_x-Werte zum Ende dieses Prozesses haben untereinander eine prozentuale Abweichung von unter 10 % (*Tab. 3.1.5.*).

3.1.4.3. Vaucheriaxanthin (Vaux)

In *Abb. 3.1.13.* sind die Verläufe der Vaucheriaxanthin (Vaux)-Konzentrationen der Versuche bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten dargestellt.

In *Abb. 3.1.13. A* zeigten die Vaux-Konzentrationen der nitratlimitierten Kulturen während der Adaptionszeit von 120 h eine deutliche Abnahme. Die Vaux-Werte der Kulturen N₁₅₀ und N₃₀₀ erholten sich danach noch einmal und fielen nach 200 h zum Prozessende hin ab. Die V_x-Konzentration der Kultur mit der geringsten Nitratverfügbarkeit (N₇₅) sank unmittelbar nach der Anpassungsphase bis zum Ende ab. Die Vaux-Konzentration der Kultur N₆₀₀ verlief bis zum Ende stationär. Der zeitliche Verlauf der Vaux-Werte der Referenzkultur erfolgte ohne Anpassungsphase und ohne eine erkennbare Tendenz über den gesamten Prozesszeitraum hinweg.

Zwischen der höchsten und der geringsten Vaux-Konzentration, also zwischen den Werten der Referenzkultur bzw. der Kultur N₆₀₀ und der Kultur mit dem geringsten Nitratangebot, (N₇₅) ergab sich nach 350 h eine Konzentrationsabnahme von 84 % (*Tab. 3.1.5.*).

In *Abb. 3.1.13. B* sind Vaux-Gehalte von Experimenten mit unterschiedlichem Phosphatangebot abgebildet. Die Anpassungsphase ist mit 48 h kürzer als bei den Versuchen mit unterschiedlichen Nitratangeboten (*Abb. 3.1.13. A*). Die Konzentrationen an Vaux blieben über die gesamte Prozessdauer stationär und zeigten am Ende, trotz unterschiedlicher Phosphatangebote, keine signifikanten Unterschiede. Die Abweichung der Vaux-Werte in allen Phosphatkulturen betrug nur 10 % (*Tab. 3.1.5.*). Unterschiedliche Phosphatangebote im Medium haben somit keine Auswirkung auf den Vaux-Gehalt in *N. salina* bei 21 °C.

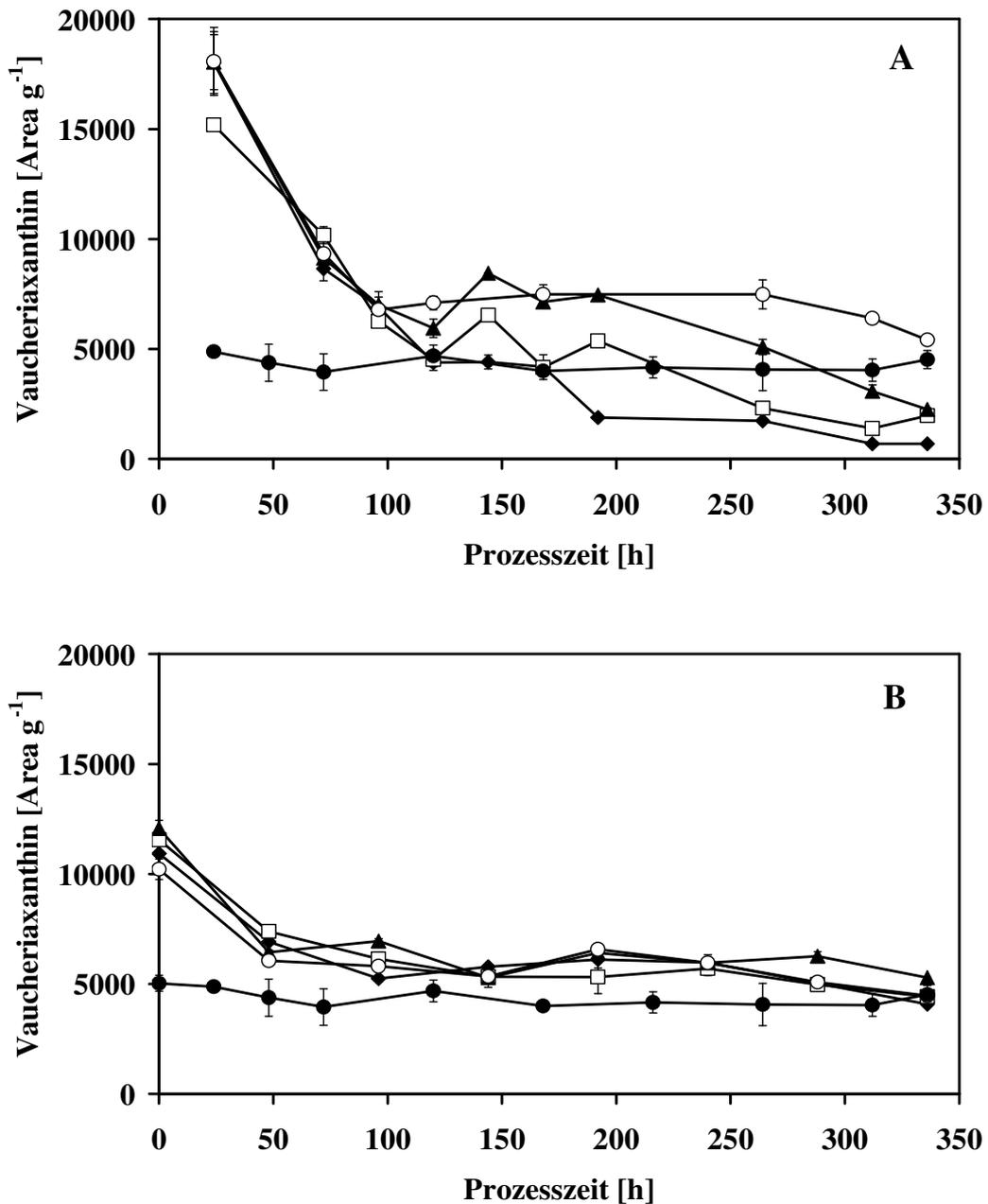


Abb. 3.1.13. Zeitlicher Verlauf von Vaucheriaxanthin Area [g^{-1}] (auf die BTM bezogen) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} L^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} L^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} L^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} L^{-1}$

3.1.4.4. β -Karotin

Der zeitliche Verlauf der β -Karotinkonzentration in *N. salina* bei unterschiedlichen Nitratangeboten ist in *Abb. 3.1.14. A* dargestellt. Auch hier, wie schon bei *Chl_a* (*Kap. 3.1.4.1.*), *V_x* (*Kap. 3.1.4.2.*) und *V_{aux}* (*Kap. 3.1.4.3.*) gezeigt, bedingte die Adaption an neue Umweltparameter eine Abnahme der Konzentration an β -Karotin. Die Anpassungsphase dauerte bei β -Karotin in N_{75} - N_{600} jedoch 96 h, anstatt wie bei oben genannten Pigmenten 120 h. β -Karotinwerte der Kulturen mit einem höheren Nitratangebot (N_{300} , N_{600}) zeigten, im Gegensatz zu Kulturen mit geringerem Nitratangebot (N_{75} , N_{150}), eine Zunahme der Konzentration, bevor sie zum Prozessende wieder abnahmen. Die mit 90 % höchste Abnahme der β -Karotinkonzentration bestand zwischen der Kultur mit geringster Nitratverfügbarkeit (N_{75}) und der Referenzkultur (*Tab. 3.1.5.*). Die Differenz der β -Karotinkonzentration der Referenz zu den Kulturen N_{300} und N_{600} betrug 67 und 30 %. Im Gegensatz zu den zeitlichen Verläufen der Referenzen der *Chl_a*- (*Abb. 3.1.11.*), *V_x*- (*Abb. 3.1.12.*) und *V_{aux}*- (*Abb. 3.1.13.*) Konzentrationen wurde den β -Karotinwerten der Referenz (*Abb. 3.1.14.*) eine Anpassungsphase von 72 h nachgewiesen. Während dieser Phase stieg die Konzentration an β -Karotin nach 50 h von 0.8 auf 0.9 mg [g BTM]⁻¹ an und fiel innerhalb der nächsten 24 h auf 0.6 mg [g BTM]⁻¹. Anschließend zeigte die β -Karotinkonzentration der Referenz bis zum Prozessende eine schwach abnehmende Tendenz auf.

In *Abb. 3.1.14. B.* ist der Verlauf der β -Karotinkonzentration in *N. salina* bei unterschiedlichen Phosphatangeboten dargestellt. In den ersten 150 h nahm die Konzentration des β -Karotins in allen Kulturen der Phosphatexperimente (P_6 - P_{50}) von 0.8 – 1.1 mg [g BTM]⁻¹ auf 0.3 – 0.5 mg [g BTM]⁻¹ ab. Für den zeitlichen Verlauf der Referenz s.o. Anschließend erholten sich die β -Karotinkonzentrationen der Kulturen mit reduziertem Phosphatangebot (P_6 - P_{50}) wieder. Nach abermaligem Absinken zeigten die β -Karotinwerte der phosphatlimitierten Kulturen und die β -Karotinwerte der Referenz zum Prozessende keinen kennzeichnenden Unterschied (*Tab. 3.1.5.*).

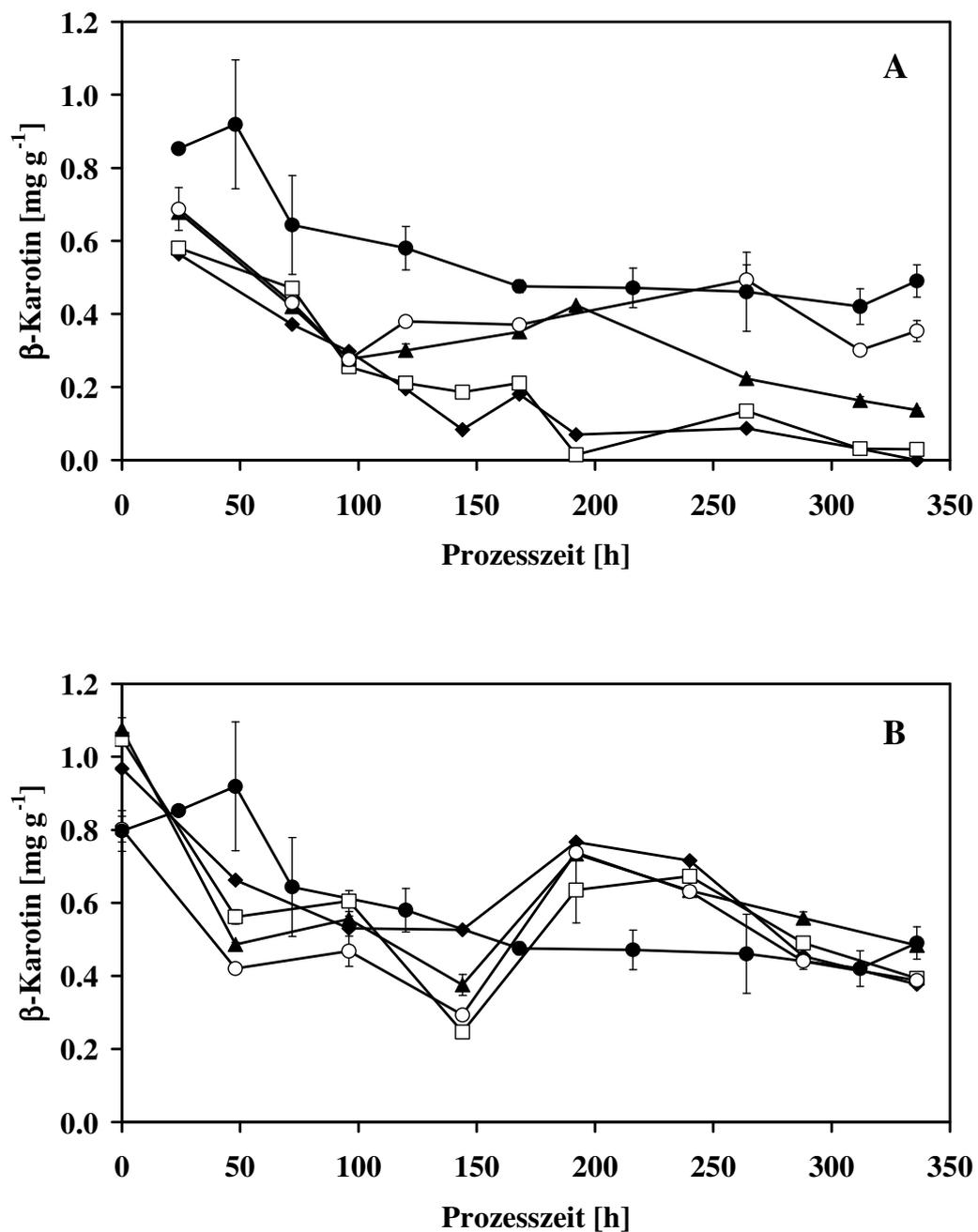


Abb. 3.1.14. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene β -Karatinkonzentration [mg g^{-1}] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$

3.1.4.5. Zeaxanthin (Zx)

In *Abb. 3.1.15.* sind die Verläufe der Zeaxanthin (Zx)-Konzentrationen der Versuche bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten dargestellt.

Die Zx-Konzentration in den nitratlimitierten Kulturen (N₇₅-N₆₀₀, *Abb. 3.1.15. A*) zeigte im zeitlichen Verlauf der Anpassungsphase, welche ca. 120 h andauerte, abnehmende Werte (N₇₅ von 0.26 auf 0.14 mg [g BTM]⁻¹; N₁₅₀ – N₆₀₀ von 0.37 auf 0.18 mg [g BTM]⁻¹). Bei gleicher Nitratversorgung war dies auch bei den Pigmenten Chl_a (*Abb. 3.1.11. A*), Vx (*Abb. 1.1.12. A*) und Vaux (*Abb. 3.1.13. A*) zu beobachten. In der anschließenden Prozesszeit bis 350 h blieben die Konzentrationen an Zx der Kulturen N₇₅ bis N₆₀₀ nahezu stationär, allein die Zx-Konzentration der Kultur N₇₅ fiel zum Prozessende ab (*Tab. 3.1.5.*).

In der Referenzkultur unterlag die Zx-Konzentration (*Abb. 3.1.15.*), wie auch die β-Karotinkonzentration (*Abb. 3.1.14.*), einer Anpassungsphase. Die Zx-Werte stiegen in den ersten 50 Prozessstunden von 0.25 auf 0.34 mg [g BTM]⁻¹ und fielen nach 72 h auf ihren Startwert zurück. Die maximale Abnahme der Zx-Konzentration von 91 % gab es am Prozessende nach 350 h zwischen den Zx-Werten der Referenz und der am stärksten nitratlimitierten Kultur (N₇₅).

Die zeitlichen Verläufe der Zx-Konzentrationen der phosphatlimitierten Kulturen (*Abb. 3.1.15. B*) zeigten eine kontinuierliche Aufwärtstendenz (mit Ausnahme des Zx-Wertes von N₃₀₀ und N₆₀₀ bei 150 h) ohne erkennbare Anpassungsphase. Dies stand im Gegensatz zu den Verläufen aller anderen analysierten Pigmente der Phosphatexperimente (*Abb. 3.1.11. – 3.1.14. B*), die zum einen alle eine Anpassungsphase zeigten und zum anderen in dieser Phase abnehmende Konzentrationen aufwiesen.

Nach 200 h stagnierte die Synthese von Zx in den Kulturen der Phosphatexperimente und die Konzentration an Zx blieb bis zum Prozessende konstant. Der Mittelwert aus den Zx-Konzentrationen der Kulturen P₆ bis P₅₀ sowie der Referenz ergab nach 350 h eine Abweichung von lediglich 6.8 % (*Tab. 3.1.5.*). Somit ist, wie auch bei allen anderen dargestellten Pigmenten (s.o.) der Phosphatexperimente, zu erkennen, dass unterschiedliche Phosphatangebote keinen Einfluss auf den Zx- bzw. Pigmentgehalt haben.

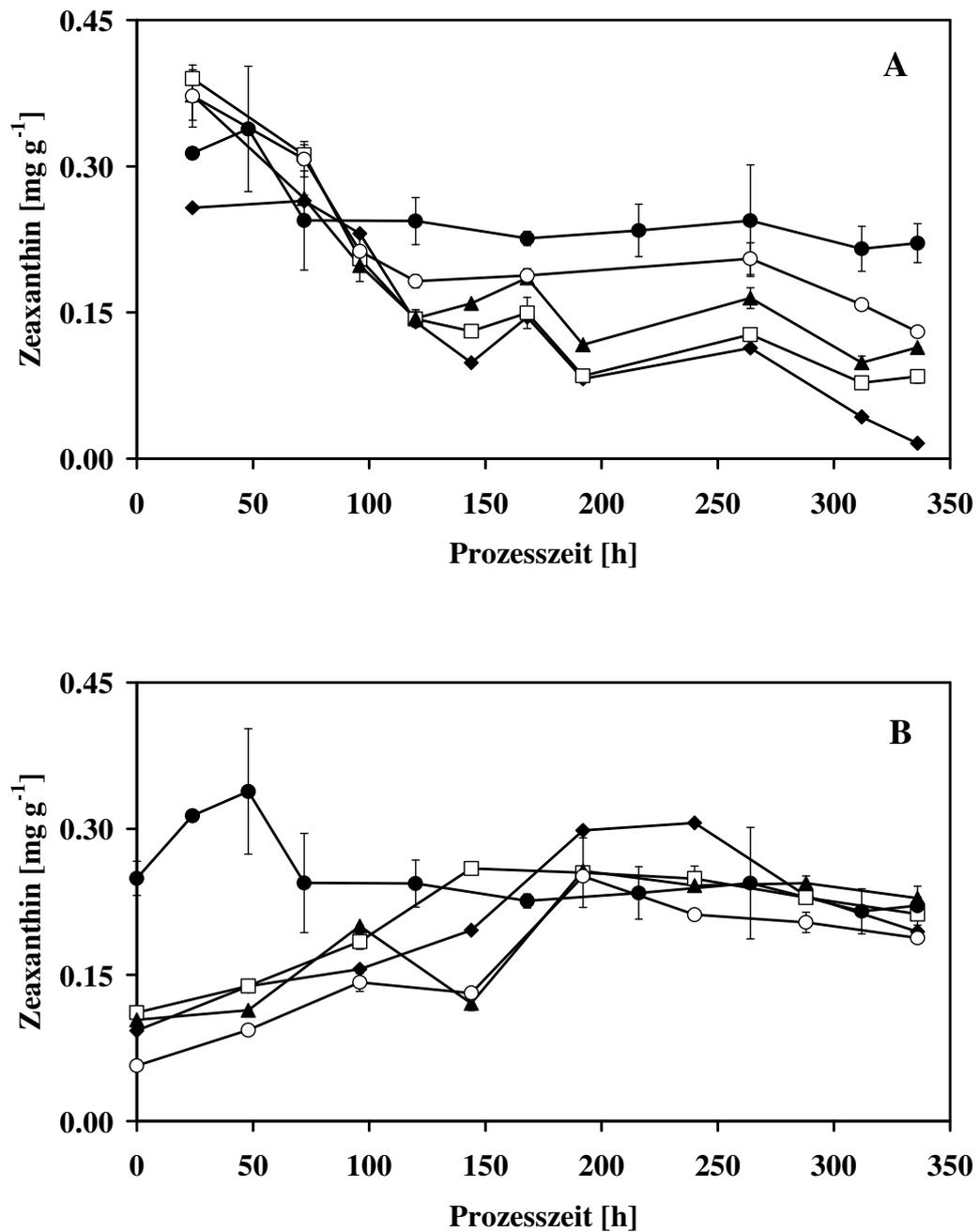


Abb. 3.1.15. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene Zeaxanthinkonzentration [mg g^{-1}] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Tab. 3.1.5. Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucherixanthin (Vaux), β -Karotin (β -Kar) und Zeaxanthin (Zx) der Experimente bei 21 °C und unterschiedlichen NO₃²⁻- und PO₄³⁻-Angeboten. Angegeben sind die Mittelwerte der letzten beiden Prozesstage (n=6) mit ihren Standardabweichungen. Alle Pigmente wurden auf die BTM [mg g⁻¹] bezogen.

NO ₃ ²⁻ [μ mol L ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [μ mol L ⁻¹]	Chl _a [mg g ⁻¹]	Vx [mg g ⁻¹]	β -Kar [mg g ⁻¹]	Zx [mg g ⁻¹]	Vaux [Area g ⁻¹]
75	90	0.57 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.04	0.02 ± 0.01	695 ± 0.0
150	90	1.41 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.08 ± 0.01	766 ± 284
300	90	4.20 ± 0.04	0.539 ± 0.14	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1992 ± 156
600	90	11.07 ± 0.19	0.83 ± 0.11	0.32 ± 0.03	0.13 ± 0.00	6096 ± 122
1800	6	13.79 ± 1.43	1.83 ± 0.28	0.42 ± 0.05	0.21 ± 0.03	4556 ± 666
1800	12	14.03 ± 0.28	1.86 ± 0.22	0.442 ± 0.07	0.22 ± 0.01	4698 ± 231
1800	25	16.73 ± 1.53	2.26 ± 0.25	0.52 ± 0.05	0.24 ± 0.01	5780 ± 691
1800	50	14.41 ± 0.78	1.87 ± 0.19	0.41 ± 0.04	0.20 ± 0.01	4779 ± 437
1800	90	12.89 ± 0.66	1.84 ± 0.12	0.46 ± 0.05	0.22 ± 0.00	4284 ± 338

3.1.5. α -Tocopherol

Die Durchführung der Analyse der α -Tocopherolkonzentrationen in *N. salina* wurde in Kap. 2.3.7. beschrieben. Die resultierenden Konzentrationen von α -Tocopherol wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und in μ g g⁻¹ angegeben.

In Abb. 3.1.16. A lagen die Startwerte in den nitratlimitierten Kulturen und in der Referenzkultur in einem Bereich zwischen 1200 und 1600 μ g α -Tocopherol [g BTM]⁻¹. Die Anpassungsphase war deutlich gekennzeichnet durch ein starkes Absinken der α -Tocopherolkonzentration in dem Prozesszeitraum von 100 - 120 h. Dabei gab es keinen Hinweis auf den Einfluss unterschiedlicher Nitratkonzentrationen auf die Anpassungsgeschwindigkeit.

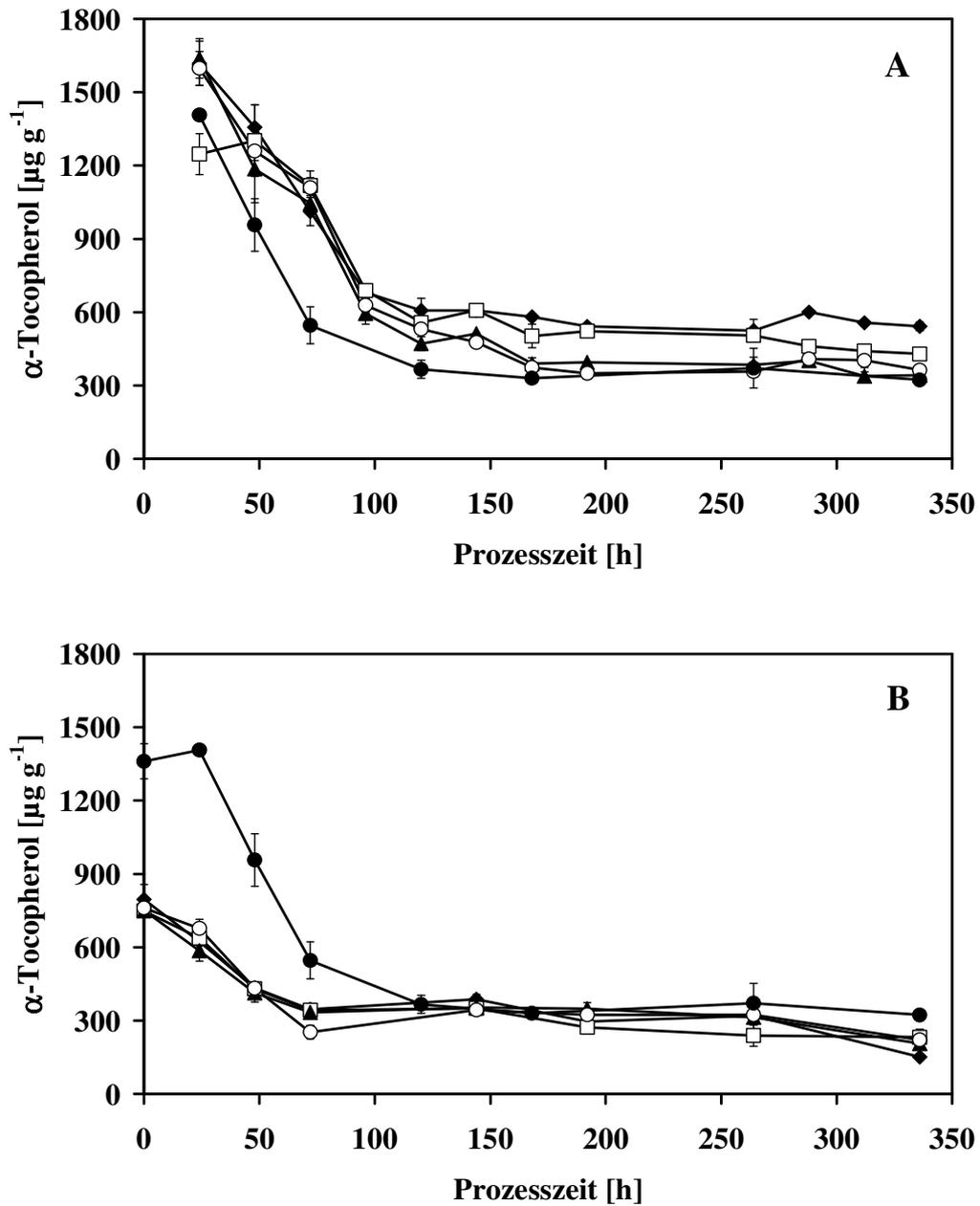


Abb. 3.1.16. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene α -Tocopherolkonzentration [$\mu\text{g g}^{-1}$] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Direkt nach der Anpassungsphase zeigten die Referenzkultur wie die Kulturen N₇₅ bis N₆₀₀ stationäre α -Tocopherolkonzentrationen (340 – 550 $\mu\text{g g}^{-1}$; *Tab. 3.1.6.*) bis zum Prozessende (350 h)

In *Abb. 3.1.16. B* wurde der Verlauf der Phosphatexperimente dargestellt. Die Startwerte in den phosphatlimitierten Kulturen lagen mit 750 bis 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ α -Tocopherol deutlich tiefer als die Startwerte der nitratlimitierten Kulturen (*Abb. 3.1.16. A*) und der Referenzkultur (*Abb. 3.1.16. A, B*). Weiterhin war die Anpassungsphase, im Vergleich zu *Abb. 3.1.16. A*, mit 72 h deutlich kürzer. Das Phosphatangebot hatte, wie auch das Nitratangebot, keinen Einfluss auf die Anpassungsgeschwindigkeit von α -Tocopherol und nur einen marginalen Einfluss auf die α -Tocopherolkonzentration. Nach der Anpassungsphase erreichten die phosphatlimitierten Kulturen (72 h) sowie die Referenzkultur (120 h) α -Tocopherolkonzentrationen von 300 $\mu\text{g g}^{-1}$. Diese blieben anschließend bis zum Prozessende konstant.

Tab. 3.1.6. Stationäre Werte von α -Tocopherol der Experimente bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten. Angegeben sind die Mittelwerte der letzten beiden Prozesstage (n=6) mit ihren Standardabweichungen. Alle α -Tocopherolwerte wurden auf die BTM [$\mu\text{g g}^{-1}$] bezogen.

Kultur	α-Toc [$\mu\text{g g}^{-1}$]
N ₇₅	549.4 ± 12.1
N ₁₅₀	435.8 ± 8.9
N ₃₀₀	340.5 ± 8.5
N ₆₀₀	383.2 ± 16.1
P ₆	150.6 ± 6.6
P ₁₂	232.3 ± 32.2
P ₂₅	206.6 ± 42.4
P ₅₀	221.2 ± 31.9
REF	323.4 ± 7.9

3.1.6. Fettsäuren (Fatty Acids, FA)

Die Fettsäureanalyse wurde wie unter *Kap. 2.3.5.* beschrieben durchgeführt.

Die Analyse ergab ein Fettsäuremuster für *N. salina*, welches überwiegend aus folgenden Fettsäuren zusammengesetzt war: Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Palmitolensäure (C16:1), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1 ω 9), Linolsäure (C18:2 ω 6), Arachidonsäure (C20:4 ω 6) und Eicosapentaensäure (C20:5 ω 3).

3.1.6.1. Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acid, TFA)

Die aus der Fettsäureanalyse resultierenden Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in % TFA [w/w BTM] angegeben.

Die *Abb. 3.1.17.* zeigt die zeitlichen Verläufe der TFA-Konzentration von *N. salina* Kulturen, die bei unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatverfügbarkeit gewachsen sind.

Beide Abbildungen (*Abb. 3.1.17 A, B*) zeigen zu Beginn des Prozesses eine Anpassungsphase in den Kulturen auf, in der die TFA-Gehalte anstiegen. Dabei lagen die Startwerte der Nitratexperimente (N₇₅ bis N₆₀₀) in einem Bereich von 30 bis 35 % TFA (*Abb. 3.1.17 A*) und die der Phosphatexperimente in einem Bereich von 8 bis 15 % TFA (*Abb. 3.1.17 B*). Weitere Unterschiede waren in der Dauer der Adaption zu erkennen. Die phosphatlimitierten Kulturen waren bereits nach 50 h adaptiert, während die nitratlimitierten Kulturen erst nach 100 h ihre Anpassungsphase bezüglich der TFA-Konzentration beendeten. Noch länger dauerte die Anpassung mit 120 h in der Referenzkultur (*Abb. 3.1.17 A, B*).

Nachdem sich die Kulturen der Nitratexperimente auf die neuen Kultivierungsparameter eingestellt hatten, stiegen die TFA-Konzentrationen in den Kulturen mit niedrigem Nitratangebot (N₇₅, N₁₅₀, N₃₀₀) auf 45 – 55 % TFA zum Prozessende an (*Tab. 3.1.7.*). Die Kultur N₆₀₀ produzierte zunächst bis zur Hälfte der Prozesszeit (170 h) konstante TFA-Konzentrationen (43 % TFA), danach hatten diese zum Prozessende hin eine abnehmende Tendenz (33 % TFA). Die mit Abstand niedrigsten TFA-Konzentrationen (20 % TFA) wurden in der Referenzkultur produziert. Am Ende war die TFA-Konzentration in der Kultur mit der niedrigsten Nitratverfügbarkeit (N₇₅) um das 3-fache (56 %) gegenüber der Referenzkultur erhöht. Die TFA-Konzentrationen lagen nach 350 h innerhalb der Nitratexperimente in einem Bereich von 19 – 53 % TFA [w/w BTM] (*Tab. 3.1.7.*). Dieses Resultat zeigte einen unverkennbaren Einfluss von Nitrat in *N. salina* bei 21 °C.

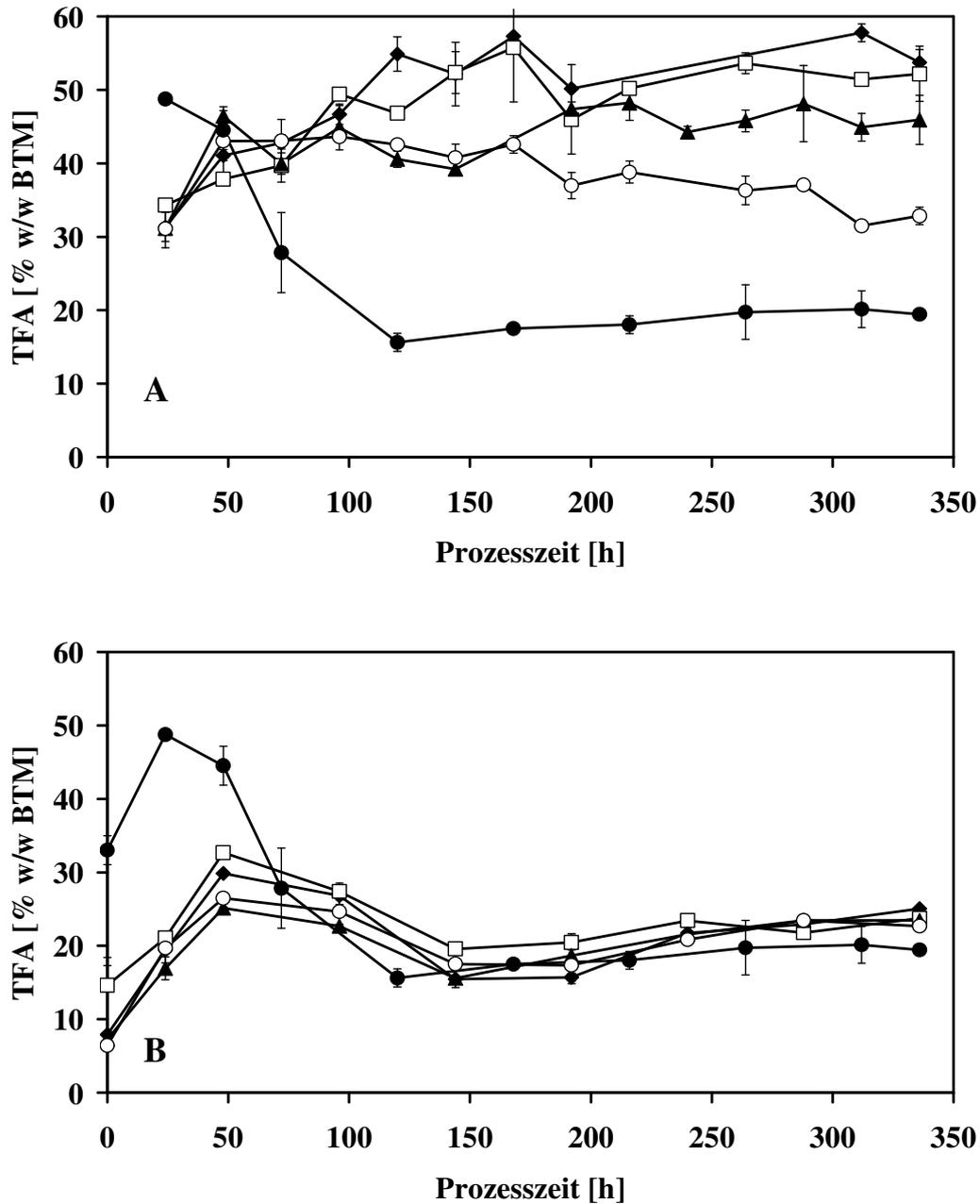


Abb. 3.1.17. Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Tab. 3.1.7. Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) nach 350 h der Experimente bei 21 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten. Die TFA-Werte sind auf die BTM [% BTM] und die EPA-Werte sind auf BTM [% BTM], auf TFA [% TFA] und auf PUFA (poly unsaturated fatty acid) [% PUFA] bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=4) der letzten beiden Prozessstage mit ihren Standardabweichungen. $\mu^* = \mu\text{mol L}^{-1}$

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μ^*]	PO ₄ ³⁻ [μ^*]	TFA [% BTM]	EPA [% BTM]	EPA [% TFA]	EPA [% PUFA]
N ₇₅	75	90	53.03 ± 0.04	1.29 ± 0.02	2.43 ± 0.04	51.64 ± 0.72
N ₁₅₀	150	90	47.68 ± 1.64	1.39 ± 0.00	2.92 ± 0.10	44.34 ± 0.62
N ₃₀₀	300	90	45.23 ± 3.67	2.14 ± 0.06	4.74 ± 0.26	50.81 ± 0.00
N ₆₀₀	600	90	30.57 ± 1.04	2.68 ± 0.08	8.78 ± 0.04	63.98 ± 2.31
P ₆	1800	6	23.76 ± 2.61	2.86 ± 0.14	12.04 ± 0.75	74.22 ± 5.57
P ₁₂	1800	12	23.67 ± 1.47	2.97 ± 0.21	12.56 ± 0.10	75.67 ± 0.71
P ₂₅	1800	25	23.18 ± 1.01	3.30 ± 0.14	14.24 ± 0.01	75.96 ± 1.81
P ₅₀	1800	50	23.38 ± 0.91	3.03 ± 0.16	12.96 ± 0.19	75.10 ± 1.50
REF	1800	90	19.06 ± 0.79	3.13 ± 0.10	16.40 ± 0.08	78.26 ± 0.76

In Abb. 3.1.17. B zeigte sich ein gleichgerichteter Zeitverlauf der TFA-Werte bei allen phosphatlimitierten Kulturen. Nach der Anpassungsphase (50 h) fielen diese von durchschnittlich 28 % TFA bis zu einer Prozesszeit von 150 h auf ca. 17 % TFA ab. Danach stiegen sie mit einem flachen Aufwärtstrend bis zum Prozessende auf 24 % TFA [w/w BTM] an (Tab. 3.1.7.). Da es keine Differenzen zwischen den TFA-Konzentrationen trotz unterschiedlicher Phosphatangebote gab, ist daraus zu schließen, dass Phosphat einen untergeordneten Einfluss auf die TFA-Produktion in *N. salina* bei 21 °C hat.

3.1.6.2. Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3)

Die in *N. salina* hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren sind C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 ω 9, C20:4 ω 6 und C20:5 ω 3. Aus dem Pool aller analysierten Fettsäuren wurde die ω 3-Fettsäure EPA genaueren Betrachtungen unterzogen. Diese Fettsäure stellte überwiegend den

bedeutendsten Anteil innerhalb der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) bis zu 78 % EPA [w/w PUFA] nach 350 h (Tab. 3.1.7.) von *N. salina* dar.

3.1.6.2.1. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration

Die Konzentrationen von EPA im folgenden Text wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und in % EPA [w/w BTM] angegeben.

Der zeitliche Verlauf der EPA-Konzentrationen, extrahiert und analysiert aus nitratlimitierten Kulturen (Abb. 3.1.18. A), zeigte keine Phase der Adaption in den ersten 100 – 120 h.

Die Startwerte von 2 % EPA blieben in den ersten 120 h konstant. Danach sanken die EPA-Werte der Kulturen mit geringstem Nitratangebot (N₇₅, N₁₅₀) nach 350 h auf 1.4 % EPA ab. Die EPA-Werte der Kulturen mit höherem Nitratangebot (N₃₀₀, N₆₀₀, REF) dagegen stiegen nach 120 h an. Die Abb. 3.1.18. A zeigt zum Prozessende EPA-Konzentrationen (1.3 – 3.1 % EPA; Tab. 3.1.7.), die sich umgekehrt zu den TFA-Konzentrationen (Abb. 3.1.17. A) der Kulturen derselben Nährstoffverfügbarkeit verhalten. Im Vollmedium (REF) produzierte *N. salina* nach 350 h die höchste Konzentration an EPA mit 3.2 %. Somit war die EPA-Konzentration in der Referenzkultur im Vergleich zur Kultur mit der geringsten Nitratverfügbarkeit (N₇₅) um das 2.4-fache erhöht.

In Abb. 3.1.18. B wird der zeitliche Verlauf der EPA-Konzentration der Phosphatexperimente gezeigt. Hier weist der Verlauf der EPA-Werte auf eine Adaptionszeit von 50 h hin. Ausgehend von Startwerten, die hauptsächlich in einem Bereich von 1.3 – 2.0 % EPA lagen, stieg die EPA-Produktion in den ersten 50 h. Danach zeigten die EPA-Werte einen, den TFA-Werten ähnlichen, konstanten Verlauf bis zu Prozessende. Alle phosphatlimitierten Kulturen erreichten nach 350 h einen Wert von 3 % (\pm 0.2) EPA (Tab. 3.1.7.) und lagen damit in demselben Wertebereich wie die Referenzkultur. Damit zeigte sich, dass Phosphatlimitierungen, im Vergleich zum Vollmedium, keine Veränderungen in der EPA-Konzentration [w/w BTM] hervorrufen, indessen Nitratlimitierungen zu einer Abnahme der EPA-Konzentration [w/w BTM] führen.

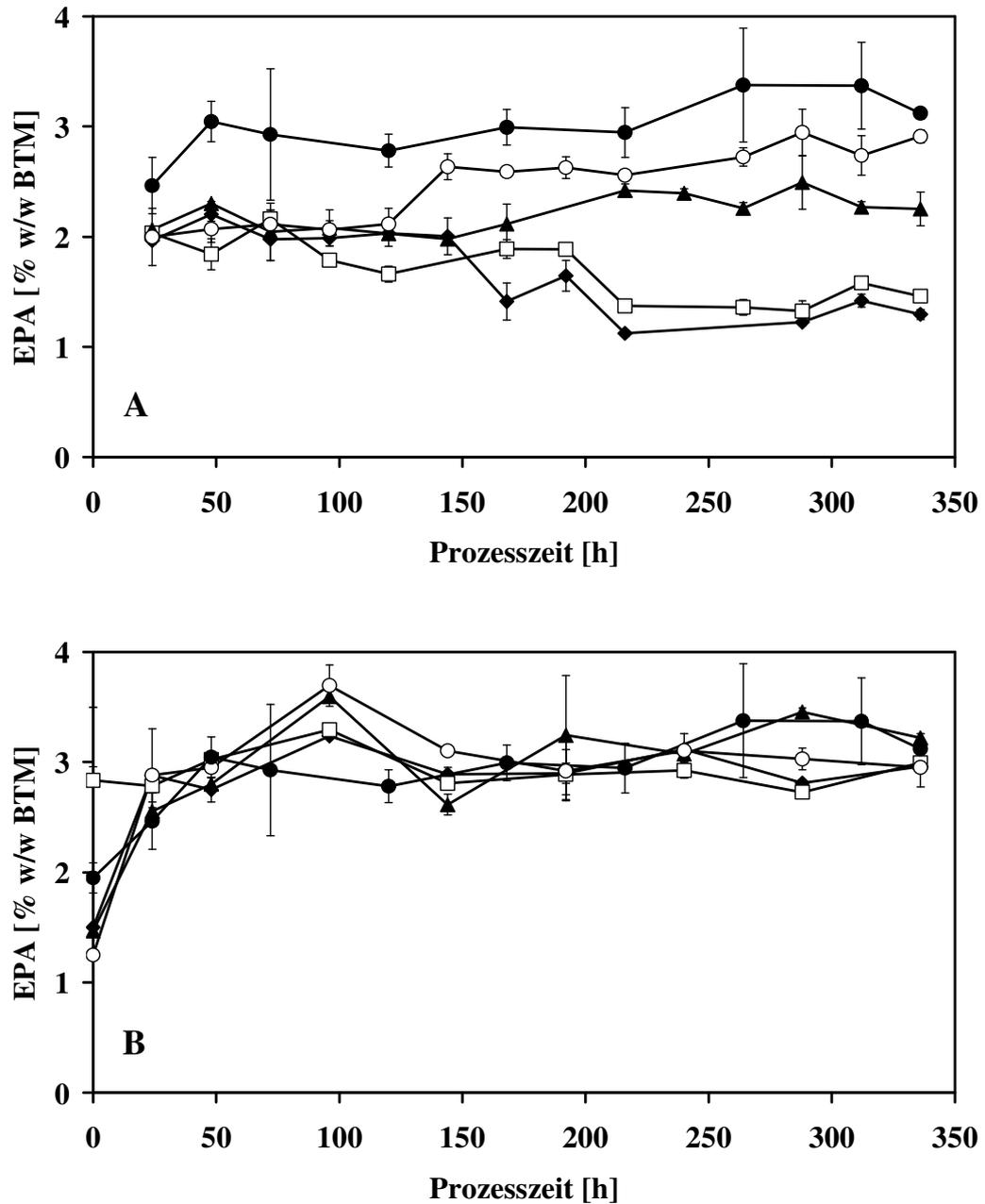


Abb. 3.1.18. Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (\blacklozenge) 75; (\square) 150; (\blacktriangle) 300; (\circ) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (\blacklozenge) 6; (\square) 12; (\blacktriangle) 25; (\circ) 50; Referenz (\bullet) $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

3.1.6.2.2. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration

In der *Abb. 3.1.19.* ist der Verlauf des prozentualen Anteils von EPA am Gesamtfettsäuregehalt (TFA) der Nitrat- und Phosphatexperimente dargestellt und wurde in EPA [% w/w TFA] angegeben.

Die Verläufe von EPA [% w/w TFA] der experimentellen Ansätze mit unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatversorgung spiegeln den Verlauf und die Endwerte von TFA [% w/w BTM] (*Abb. 3.1.17.*) diametral wider.

Der zeitliche Verlauf von EPA [% w/w TFA] in der Referenzkultur (*Abb. 3.1.19. A*) stieg mit einem Startwert von 5 % in den ersten 120 h der Anpassungsphase auf 16 % EPA an. Danach blieb EPA [% w/w TFA] bis zum Prozessende konstant. Am Prozessende lag der Anteil von EPA an TFA in der Referenzkultur um das 2- bis 7-fache über den Konzentrationen von EPA [% w/w TFA] der nitratlimitierten Kulturen.

In *Abb. 3.1.19. B* lagen die Startwerte der phosphatlimitierten Kulturen mit 13 - 15 % EPA deutlich über dem Startwert der Referenzkultur (6 % EPA; *Abb. 3.1.19. A, B*). Innerhalb der Anpassungsphase (ca. 120 h) sank EPA [% w/w TFA] in allen phosphatlimitierten Kulturen auf 10 % ab und stieg wieder an, wobei die EPA-Konzentrationen unterhalb der Startwerte blieben. Am Prozessende nach 350 h wurden für diese Kulturen EPA-Werte von ca. 13 % ermittelt.

Der Anteil von EPA an TFA in der Referenzkultur nahm in den ersten 120 h des Reaktorprozesses kontinuierlich zu und blieb danach bis zum Prozessende konstant. Nach 350 h lag EPA [% w/w TFA] in der Referenzkultur mit einem Wert von 16 % EPA etwa 3 % höher als EPA [% w/w TFA] in den phosphatlimitierten Kulturen.

Im Gegensatz zu Nitrat hat Phosphat nur einen minimalen Einfluss auf den Anteil des EPA-Gehalts am Gesamtfettsäuregehalt.

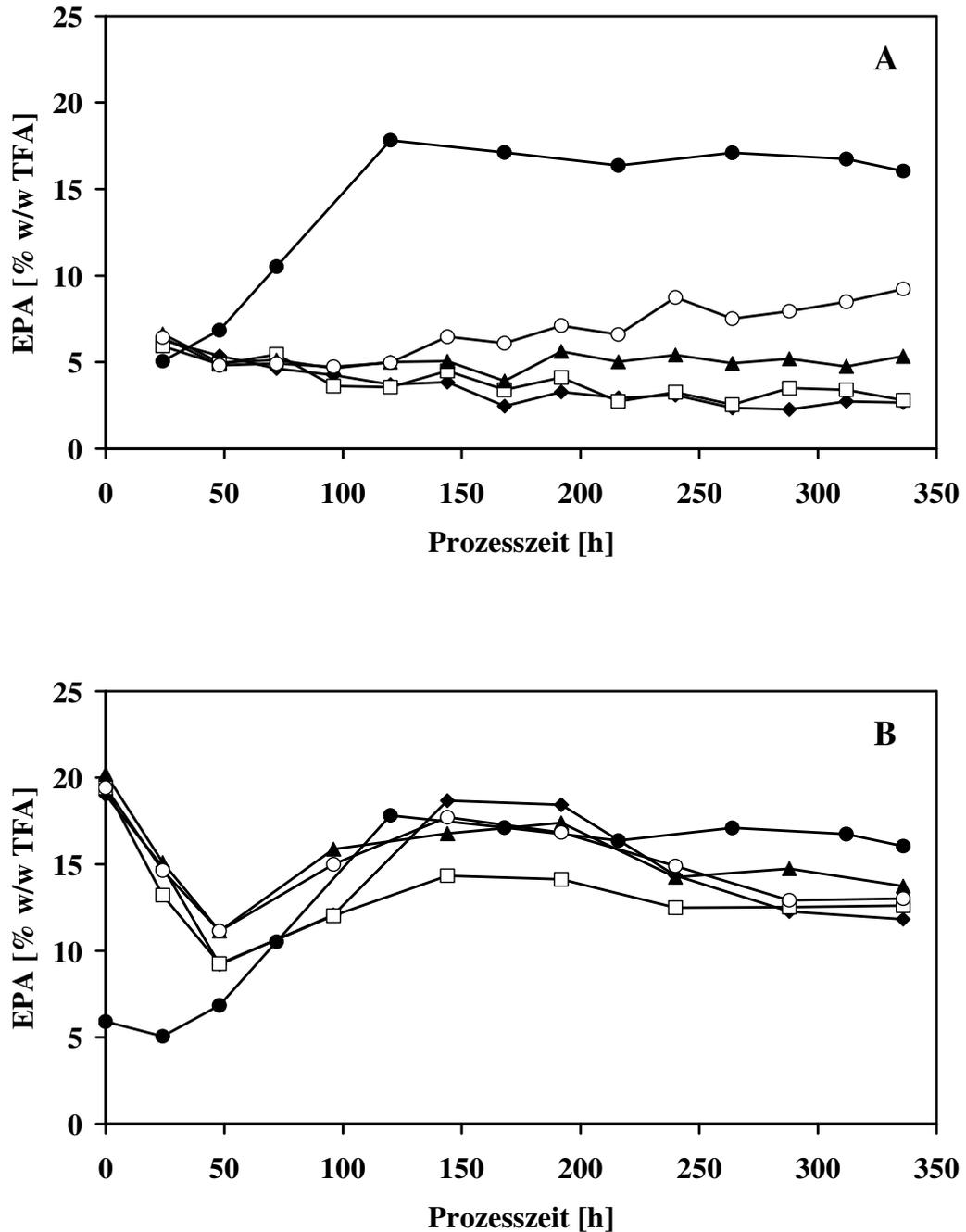


Abb. 3.1.19. Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils von Eicosapentaensäure (EPA) am Gesamtsäurefettgehalt (TFA) [% w/w TFA] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$

3.1.7. Nährstoffe

Unterschiedliche Nitrat- und Phosphatangebote im Medium lassen noch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Nährstoffaufnahme in die Zelle zu. Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Stickstoff- und Phosphatkonzentration in *N. salina* Kulturen sowie deren Medien sollten Hinweise auf das zelluläre Aufnahmeverhalten von Nitrat und Phosphat geben.

3.1.7.1. Intra- und extrazelluläre Stickstoffkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot in den Reservoiren

In *Abb. 3.1.20.* sind die zeitlichen Verläufe der intra- und extrazellulären Stickstoffkonzentrationen (C_{Nintra} , C_{Nextra}) von Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot im Medium dargestellt.

Die Startwerte des intrazellulären Stickstoffs (*Abb. 3.1.20. A*) der nitratlimitierten Kulturen lagen in einem Bereich von 30 – 40 mg N [g BTM]⁻¹, wohingegen der Startwert der Referenzkultur bei 53 mg N [g BTM]⁻¹ lag. Im Laufe des Prozesses stieg die intrazelluläre Stickstoffkonzentration (C_{Nintra}) der Referenzkultur leicht auf 61 mg N [g BTM]⁻¹, C_{Nintra} der Kultur N_{600} blieb konstant und C_{Nintra} der geringer nitratversorgten Kulturen (N_{75} , N_{150} , N_{300}) fielen auf 16 – 25 mg N [g BTM]⁻¹ ab. Somit folgten die intrazellulären Stickstoffkonzentrationen am Prozessende der Abnahme der Nitratverfügbarkeit aus den Medien, wobei die Referenzkultur eine 4-fach höhere intrazelluläre Stickstoffkonzentration gegenüber der Kultur mit der niedrigsten Nitratverfügbarkeit (N_{75}) erzielte.

Anhand der zeitlichen Verläufe der extrazellulären Stickstoffkonzentrationen (C_{Nextra}) der Nitratexperimente in *Abb. 3.1.20. B* ist zu erkennen, dass unabhängig von angebotener Nitratkonzentration und mit der Ausnahme von 75 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$ die nitratlimitierten Kulturen einheitlich 120-130 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ innerhalb der ersten 50 h verbrauchten. In den Kulturen mit dem geringsten Nitratangebot (N_{75} , N_{150} ; Graphen decken sich) wurde Stickstoff schon 50 h nach Prozessbeginn nahezu vollständig aus dem Medium aufgenommen. Da die Wachstumsrate beider Kulturen im turbidostatischen Prozess durch Zugabe von frischem Medium in die Reaktoren kompensiert wurde, um die OD konstant zu halten, gab es immer wieder ein Angebot an Nitrat. Dieses Angebot wurde jedoch bis zum Prozessende vollständig und kontinuierlich dem Medium entzogen. Das gleiche traf für die Kultur N_{300} ab einer

Prozesszeit von 200 h zu. Eine beständige Abnahme von Nitrat aus dem Medium zeigte ebenfalls die Kultur N₆₀₀, welche erst zum Prozessende Nitrat vollständig aufnahm.

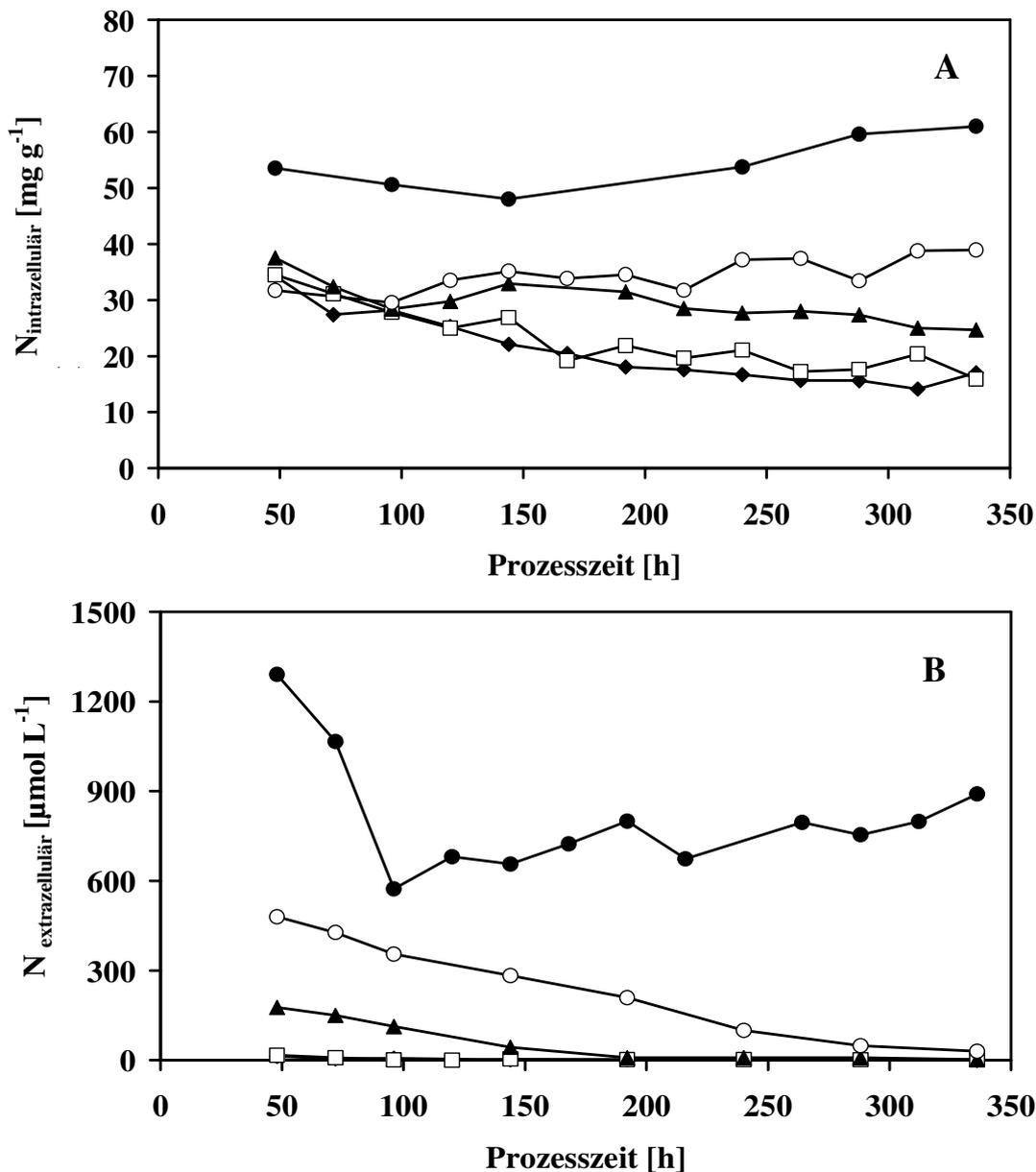


Abb. 3.1.20. Zeitliche Verläufe der auf die BTM bezogene intrazelluläre Stickstoffkonzentration [mg g⁻¹] (A) und extrazellulären Stickstoffkonzentration im Medium [μmol L⁻¹] (B) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. Variierende Nitratkonzentrationen (μmol NO₃²⁻ L⁻¹) in den Medienreservoir: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; Referenz (●) 1800 μmol NO₃²⁻ L⁻¹ und 90 μmol PO₄³⁻ L⁻¹

Ganz anders stellte sich der Verlauf von $C_{N_{extra}}$ im Vollmedium (REF) dar. Schon nach 50 h entzog diese Kultur mit $500 \mu\text{mol N L}^{-1}$ das 4-fache an Stickstoff aus dem Medium, als es die nitratlimitierten Kulturen tun. Den höchsten Verbrauch an Nitrat mit $1200 \mu\text{mol N L}^{-1}$ hatte die Referenzkultur nach 100 h ($C_{N_{extra}} = 600 \mu\text{mol N L}^{-1}$), welcher danach bis zum Prozessende etwas nachließ, denn die Nitratkonzentration im Medium stieg wieder leicht auf $900 \mu\text{mol N L}^{-1}$ an.

3.1.7.2. Intra- und extrazelluläre Phosphatkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot in den Reservoiren

In der *Abb. 3.1.21.* sind die Verläufe der intra- und extrazellulären Phosphatkonzentrationen der unterschiedlich mit Phosphat versorgten *N. salina* Kulturen dargestellt.

Der Startwert des intrazellulären Phosphatgehaltes der Referenzkultur lag mit $26 \text{ mg [g BTM]}^{-1}$ um das 3- bis 4-fache über den Startwerten der phosphatlimitierten Kulturen (*Abb. 3.1.21. A*), fiel jedoch innerhalb der nächsten 100 h auf $10 \text{ mg [g BTM]}^{-1}$ ab. Anschließend stieg $C_{P_{intra}}$ in der Referenzkultur wieder an und erreichte einen Endwert, der mit $13 \text{ mg [g BTM]}^{-1}$ über denen der phosphatlimitierten Kulturen lag. Nahezu stationär zeigten sich die zeitlichen Verläufe von $C_{P_{intra}}$ der phosphatlimitierten Kulturen, deren Startwerte in einem Bereich zwischen 6 und 8 mg und deren Endwerte zwischen 6 und 10 mg $[\text{g BTM}]^{-1}$ lagen.

Gegenüber $C_{P_{intra}}$ (*Abb. 3.1.21. A*) sind in *Abb. 3.1.21. B* die Verläufe der extrazellulären Phosphatkonzentrationen ($C_{P_{extra}}$) dargestellt. Die *Abb. 3.1.21. B* belegt, dass bereits 24 h nach Prozessbeginn mehr als 50 % (± 4 %) des Phosphatvorkommens im Medium der Kulturen P_{25} , P_{50} und der Referenz in die Zellen aufgenommen wurde. Das bedeutete dennoch, dass sich die Menge an aufgenommenem Phosphat unterschied. Zum Zeitpunkt $t = 50 \text{ h}$ nach Prozessbeginn fand die maximale Aufnahme von Phosphat aus dem Vollmedium (REF) statt, an dem insgesamt $84 \mu\text{mol P L}^{-1}$ verbraucht wurden. Das entsprach 93 % der Startkonzentration an Phosphat. Bei allen Kulturen (*Abb. 3.1.21. B*) konnte beobachtet werden, dass sich die höchste Phosphataufnahme im Prozesszeitraum von 50 bis 100 h bewegte. Dabei entsprach die prozentuale Abnahme an Phosphat 76 bis 93 % der bereitgestellten Konzentrationen von 6, 12, 25, 50 und $90 \mu\text{mol P L}^{-1}$. Am Prozessende unterschieden sich die Werte der Kulturen P_6 , P_{12} und P_{25} mit einem Wert von $C_{P_{extra}} = 2.4 (\pm$

1.1) $\mu\text{mol L}^{-1}$ nur unwesentlich, während die Endwerte der Kultur P₅₀ und der Referenz mit $C_{\text{Pextra}} = 15.8$ und $25.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ deutlich über diesem Wert lagen.

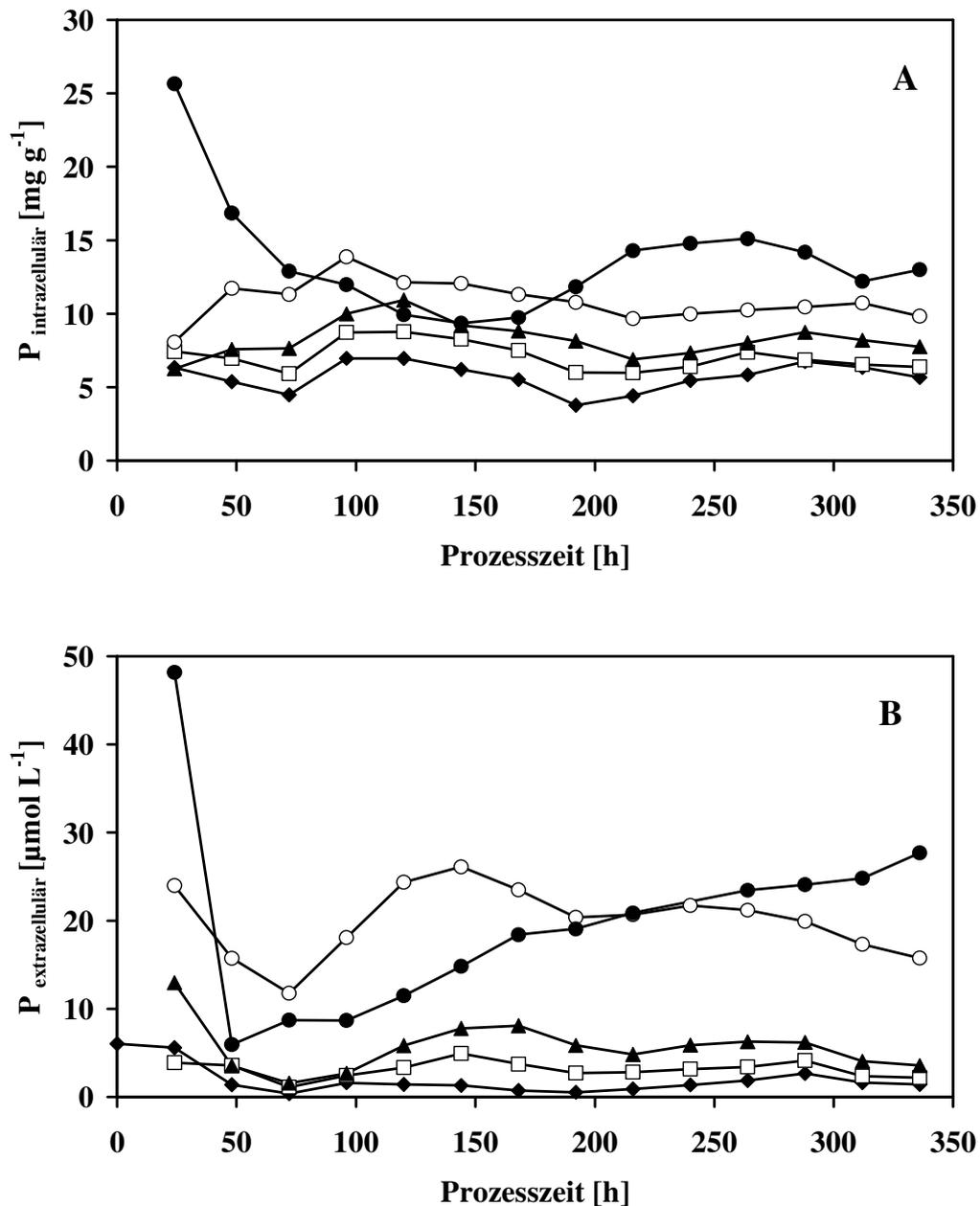


Abb. 3.1.21. Zeitliche Verläufe der auf die BTM bezogene intrazelluläre Phosphatkonzentration mg g^{-1} (A) und extrazellulären Phosphatkonzentration im Medium $[\mu\text{mol L}^{-1}]$ (B) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21°C . Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) $1800 \mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und $90 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

3.1.7.3. Intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration in Kulturen mit unterschiedlichem Nitrat- und Phosphatangebot in den Reservoiren

Die Bestimmung der intrazellulären Kohlenstoffkonzentration (C_{Cintra}) diente zur Ermittlung des C/N-Verhältnisses (Kap. 3.1.7.4.) in *N. salina*, welches sich während der Kultivierung im turbidostatischen Prozess bei unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten entwickelte.

Die Darstellung des Verhältnisses von Kohlenstoff zu Stickstoff gibt noch einmal deutlich wieder, wie die Verfügbarkeit von Stickstoff in den Kulturexperimenten war. Je kleiner der C/N-Wert, desto besser war die Stickstoffverfügbarkeit.

In der Abb. 3.1.22. sind die zeitlichen Verläufe der intrazellulären Kohlenstoffkonzentrationen (C_{Cintra}) der Kulturen der Nitrat- und Phosphatexperimente zu sehen. Diese zeigten weder einen abnehmenden noch zunehmenden Trend an C_{Cintra} über den gesamten Prozesszeitraum hinweg.

Innerhalb der Nitratexperimente (Abb. 3.1.22. A) bewegten sich die Kohlenstoffkonzentrationen in einem Wertebereich von 550 bis 770 mg [g BTM]⁻¹. Die Fixierung von Kohlenstoff der Phosphatkulturen (Abb. 3.1.22. B) zeigte sich kontinuierlich bei einem Wert um 600 mg [g BTM]⁻¹ während der Dauer der Reaktorprozesse. Dieser Wert lag in dem gleichen Konzentrationsbereich der Stickstoffkulturen und lässt den Rückschluss zu, dass unterschiedliche Nitrat- wie auch Phosphatverfügbarkeiten keinen Einfluss auf die Kohlenstofffixierung haben.

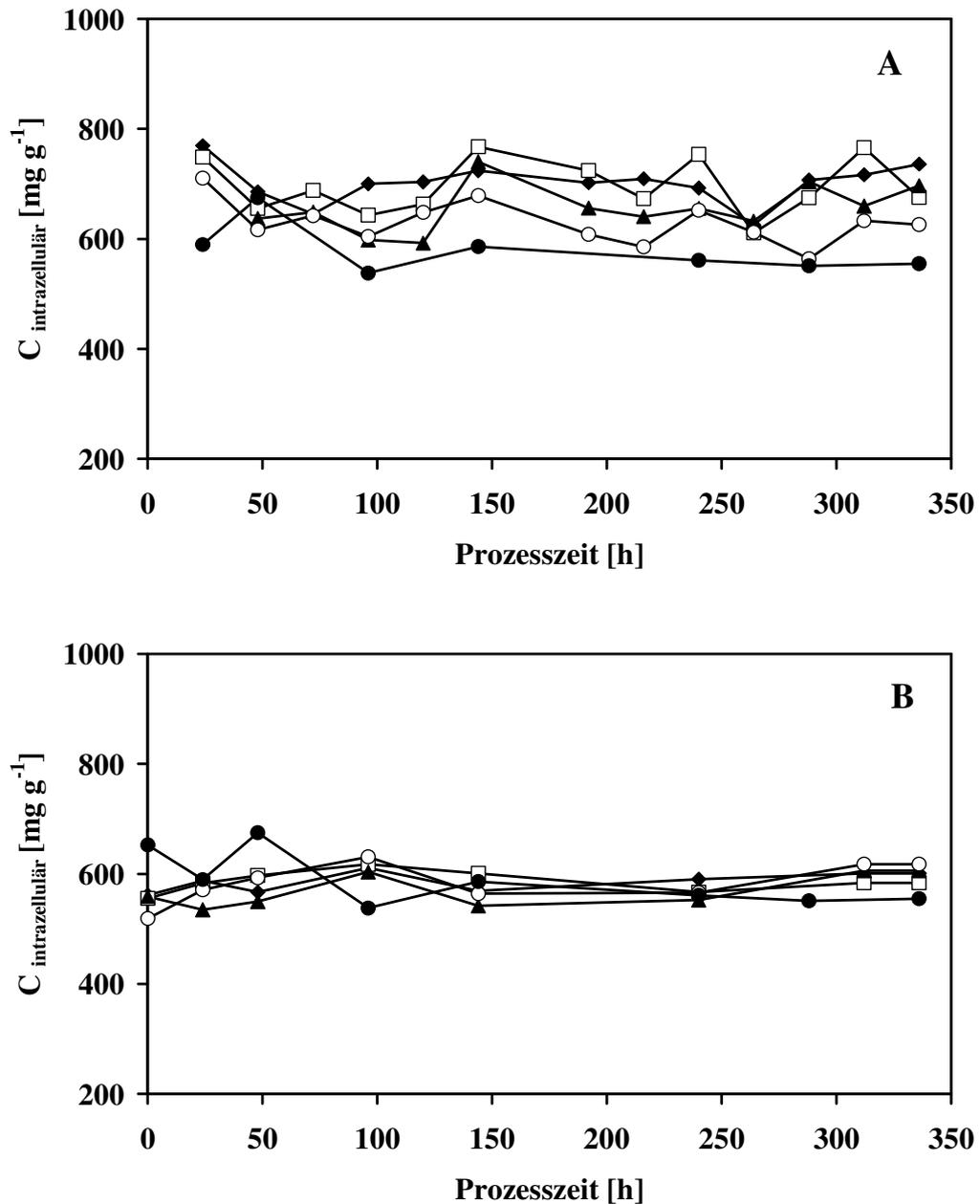


Abb. 3.1.22. Zeitliche Verläufe der auf die BTM bezogene intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration [mg g^{-1}] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$) in den Medien-Reservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

3.1.7.4. C/N-Bestimmung in Kulturen mit unterschiedlichem Nitrat- und Phosphatangebot in den Reservoiren

Aus den Konzentrationen von Stickstoff (*Kap. 3.1.7.1.*) und Kohlenstoff (*Kap. 3.1.7.3.*) in *N. salina* wurde das Verhältnis aus beiden Elementen gebildet.

In *Abb. 3.1.23. A* sind die C/N-Verhältnisse der Kulturen der Stickstoffexperimente und der Referenzkultur dargestellt. Im Vergleich zur Referenzkultur ($C/N = 9$) stieg das C/N-Verhältnis aller nitratlimitierten Kulturen ($C/N = 16 - 49$) bis zum Prozessende kontinuierlich an. Dabei stellten sich die zeitlichen Verläufe von C/N im umgekehrten Verhältnis zur Nitratverfügbarkeit dar, was bestätigt, dass eine abnehmende Bereitstellung von Stickstoff zu einer Anhebung des C/N-Verhältnisses führt.

Die *Abb. 3.1.23. B* stellt das C/N-Verhältnis der Phosphatexperimente dar. In diesen Kulturen blieb das C/N-Verhältnis über den gesamten Prozesszeitraum konstant und wich nicht vom C/N-Verhältnis der Referenz ab.

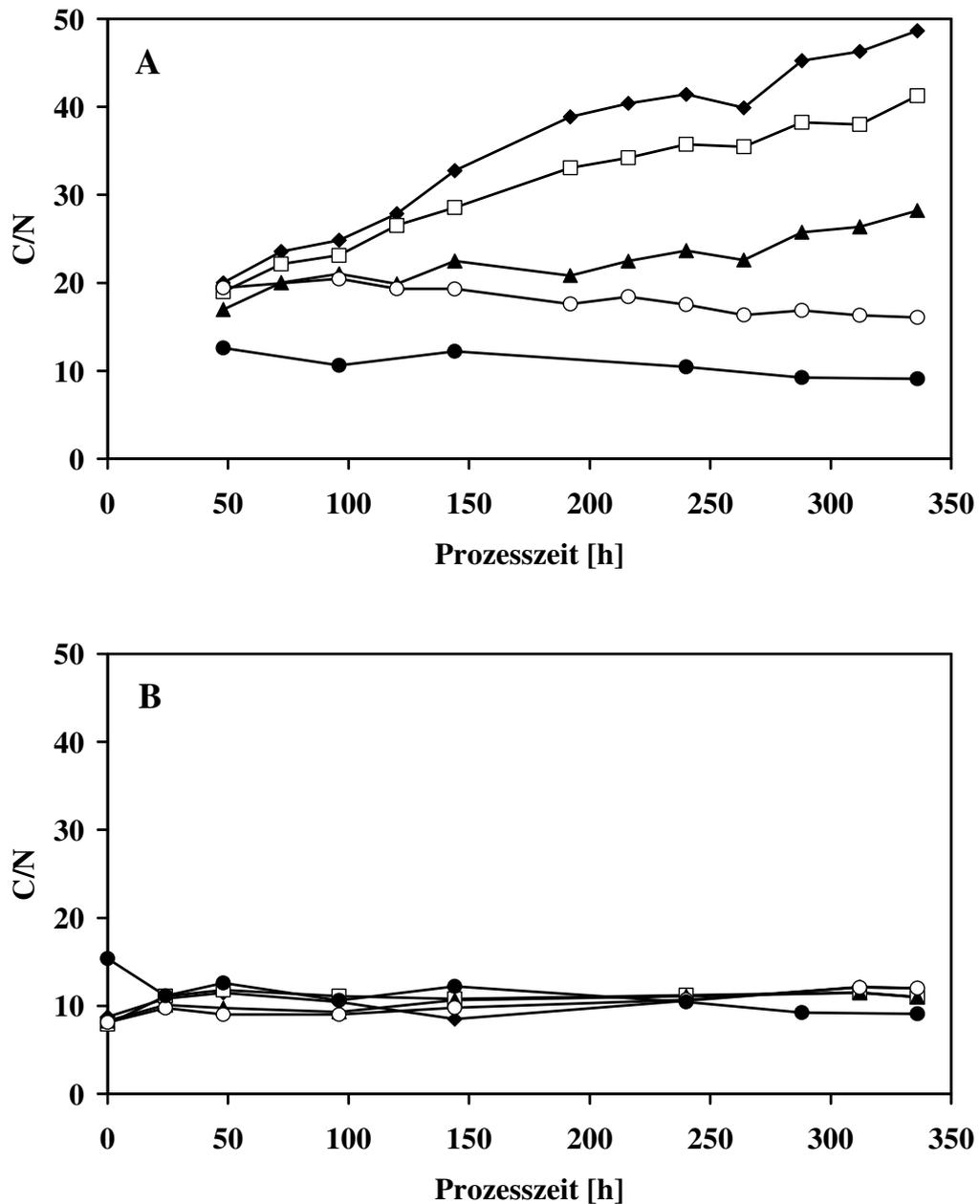


Abb. 3.1.23. Zeitliche Verläufe des C/N-Verhältnisses von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 21 °C. (A) Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600, (B) Variierende Phosphatkonzentrationen ($\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) in den Medienreservoirien (◆) 6; (□) 12; (▲) 25; (○) 50; Referenz (●) 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{ L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$

3.2. Ergebnisse der Kultivierungen von *Nannochloropsis salina* bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten in den Reservoiren

Im folgenden Kapitel wurden Ergebnisse von *N. salina* hinsichtlich ihrer physiologischen Zustände (Fluoreszenz) und Parameter (Pigmente, Fettsäuren, α -Tocopherol) bei unterschiedlichen Nährstoffangeboten bei 17 °C präsentiert.

Für die Kultivierungsexperimente von *N. salina* im Photobioreaktor bei 17 °C wurden folgende drei Kulturen eingesetzt: eine Referenzkultur (REF), eine Kultur mit stark limitiertem Nitratangebot (N₇₅) und eine Kultur mit stark limitiertem Phosphatangebot (P₆) (Kap. 2.2.).

Die Auswahl der o.g. Kulturen begründete sich zum einen in der Annahme, dass die am stärksten nitratlimitierte Kultur N₇₅, im Zuge der Untersuchungen bei 21 °C, die deutlichsten Abweichungen in ihren Ergebnissen von der Referenz zeigte. Beachtlich waren dabei die hohen TFA-Konzentrationen in der Kultur N₇₅ (Abb. 3.1.17.), die sich deutlich von den TFA-Konzentrationen der Referenz (Abb. 3.1.17.) absetzten.

Weiterhin zeigten die Phosphatexperimente bei 21 °C nur schwach ausgeprägte physiologische Veränderungen, so dass bei 17 °C lediglich die Kultur P₆, mit dem größten Konzentrationsunterschied an Phosphat zur Referenzkultur, untersucht.

3.2.1. Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen der Photobioreaktorexperimente, mit einer Kultivierungstemperatur von 17 °C, wurden mit zwei unterschiedlichen PAM-Messgeräten (Kap. 2.3.1.) durchgeführt. Die aus diesen Messungen erhaltenen F- und F_M'-Signale sind auf den jeweils zur Kultur gehörigen Startwert normiert worden (Tab. 3.2.1., 3.2.2.). Die Normierungen wurden vorgenommen, um Tendenzen erkennbar zu machen (Kap. 3.1.1.).

Tab. 3.2.1. Startwerte der online gemessenen Fluoreszenzsignale *F* und *F_M'* zu Beginn des turbidostatischen Prozesses bei 17 °C (*normiert siehe Text)

Kultur	F	F _M '
N ₇₅	104 ± 1	173 ± 0
P ₆	133 ± 0	247 ± 3
REF	116 ± 2	197 ± 1

Tab. 3.2.2. Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' zu Beginn des turbidostatischen Prozesses bei 17 °C (*normiert siehe Text)

Kultur	F	F_M'
N ₇₅	0.050	0.099
P ₆	0.064	0.120
REF	0.030	0.082

3.2.1.1. Online-Fluoreszenzsignale

Die zeitlichen Verläufe der *online* gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' der Kulturexperimente bei 17 °C sind in *Abb. 3.2.1.* dargestellt.

Die Anpassungsphase erstreckte sich in den Kulturen bei F (*Abb. 3.2.1. A*) und F_M' (*Abb. 3.2.1. B*) bis ca. 120 h nach Prozessbeginn. Innerhalb dieser 120 h sanken in der Referenzkultur und in der Kultur P₆ die Signale F und F_M' nach 24 – 50 h auf 0.7 r.E. um 30 % auf ihren Tiefstwert ab, wohingegen die Signale F und F_M' der Kultur N₇₅ nach 75 h auf 0.4 bzw. 0.5 r.E., um 50 - 60 % abnahmen. Im Anschluss an die Anpassungsphase erlangten die F und F_M' -Signale der Referenzkultur ihre maximalen Werte nach insgesamt 170 h. Diese waren gegenüber den Startwerten um 20 % (F , *Abb. 3.2.1. A*) und 60 % (F_M' , *Abb. 3.2.1. B*) erhöht. Am Prozessende zeigten die F -Signale der Referenzkultur und der Kultur P₆ untereinander keine Abweichungen und waren äquivalent zu den Startwerten. Im Gegensatz dazu zeigten die F_M' -Signale der Referenzkultur und der Kultur P₆ deutliche Unterschiede nach 350 h am Prozessende. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die F_M' -Signale der Kultur P₆ den gleichen Wert wie zu Beginn des Experimentes, während die F_M' -Signale der Referenz um 30 %, gegenüber dem Startwert höher lagen. Die Fluoreszenzsignale F und F_M' der Kultur N₇₅ zeigten nach der Adaptionzeit ($t=120$ h) eine weiterhin abnehmende Tendenz und hatten nach 350 h um 70 % (F) und um 80 % (F_M'), im Vergleich zu den Startwerten, abgenommen. Die Gegenüberstellung der Endwerte der Kultur P₆ mit der Referenzkultur lässt vermuten, dass eine Phosphatlimitierung keinen Einfluss auf die F -Signalstärke hat (*Abb. 3.2.1. A*), jedoch ein um 20 % verringertes F_M' -Signal hervorruft (*Abb. 3.2.1. B*). Ein Vergleich der Kultur N₇₅ mit der Referenzkultur ergab, dass eine Nitratlimitierung eine Abnahme der F -

Signals um 70 % (Abb. 3.2.1. A) und eine Abnahme des F_M' -Signals um 80 % (Abb. 3.2.1. B) bewirkt.

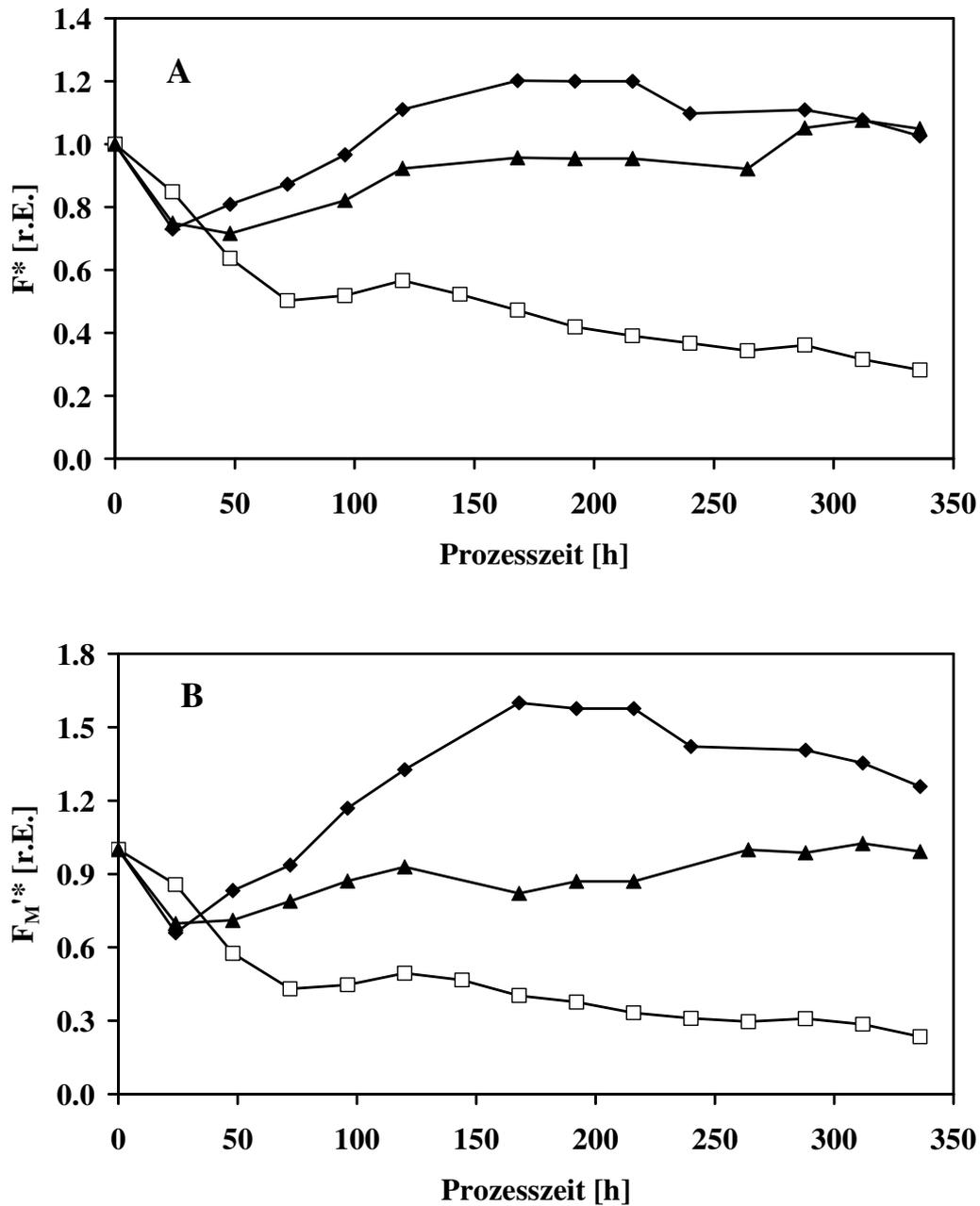


Abb. 3.2.1. Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C (* normiert). (♦) REF; (□) N_{75} ; (▲) P_6

Der aus den F - und F_M' -Signalen (Abb. 3.2.1.) ermittelte zeitliche Verlauf der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} ist in Abb. 3.2.2. dargestellt.

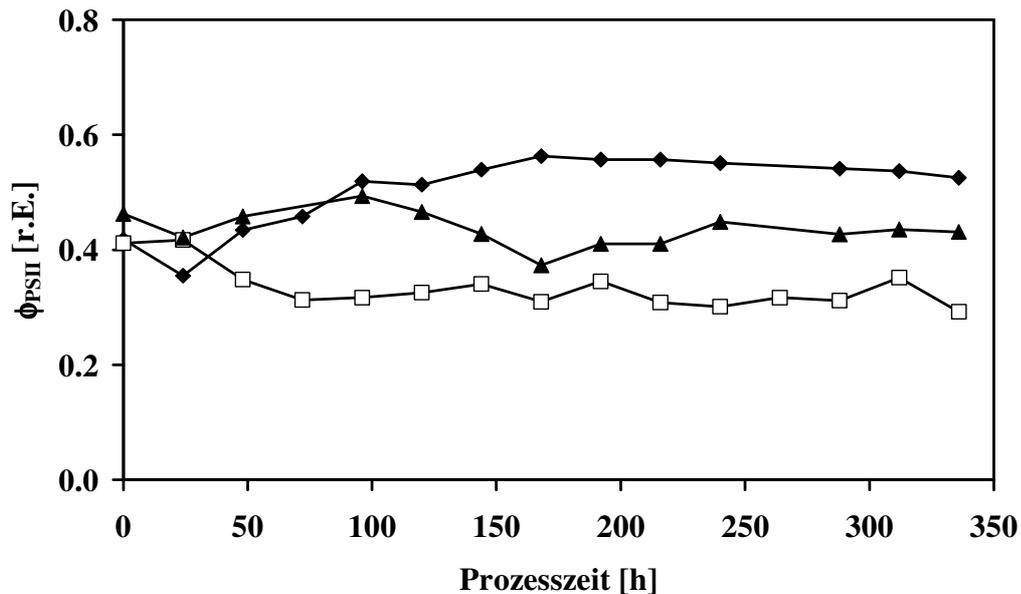


Abb. 3.2.2. Zeitlicher Verlauf der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C, ermittelt aus den online gemessenen Fluoreszenzsignalen F und F_M' (Abb. 3.2.1.) (* normiert). (◆) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

In den ersten 100 Prozessstunden stieg ϕ_{PSII} in der Referenzkultur von 0.4 auf 0.5 r.E. an, blieb konstant in der Kultur P₆ und sank in der Kultur N₇₅ von 0.4 auf 0.3 r.E. ab. Danach blieben die ϕ_{PSII} -Werte der Referenzkultur, der Kultur P₆ und der Kultur N₇₅ bis zum Prozessende konstant.

Nach 350 h lag der ϕ_{PSII} -Wert, im Vergleich zu den Startwerten, in der Referenzkultur um 30 % erhöht vor, in der Kultur P₆ war der ϕ_{PSII} -Wert unverändert und in der Kultur N₇₅ war ϕ_{PSII} um 30 % abgesunken.

Der Effekt der Phosphatlimitierung auf ϕ_{PSII} wurde durch eine Abnahme um 20 % und der Effekt der Nitratlimitierung auf ϕ_{PSII} durch eine Abnahme um 45 %, im Vergleich zu den ϕ_{PSII} -Endwerten der Referenz, sichtbar.

3.2.1.2. Inline-Fluoreszenzsignale

Die zeitlichen Verläufe der *inline* gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' der Kulturexperimente bei 17 °C sind in Abb. 3.2.3. dargestellt.

Die Adaptionsphase erstreckte sich über die ersten 100 h des Prozesses. Ausgehend von den normierten Startwerten sanken die Signale F und F_M' nach 50 h in der Referenzkultur um 90 %, in der Kultur P_6 um 40 % und in der Kultur N_{75} um 80 % auf ihren Tiefstwert. Danach stiegen F und F_M' in der Referenzkultur und in der Kultur P_6 bis 100 h auf 0.8 und 0.9 r.E. wieder an.

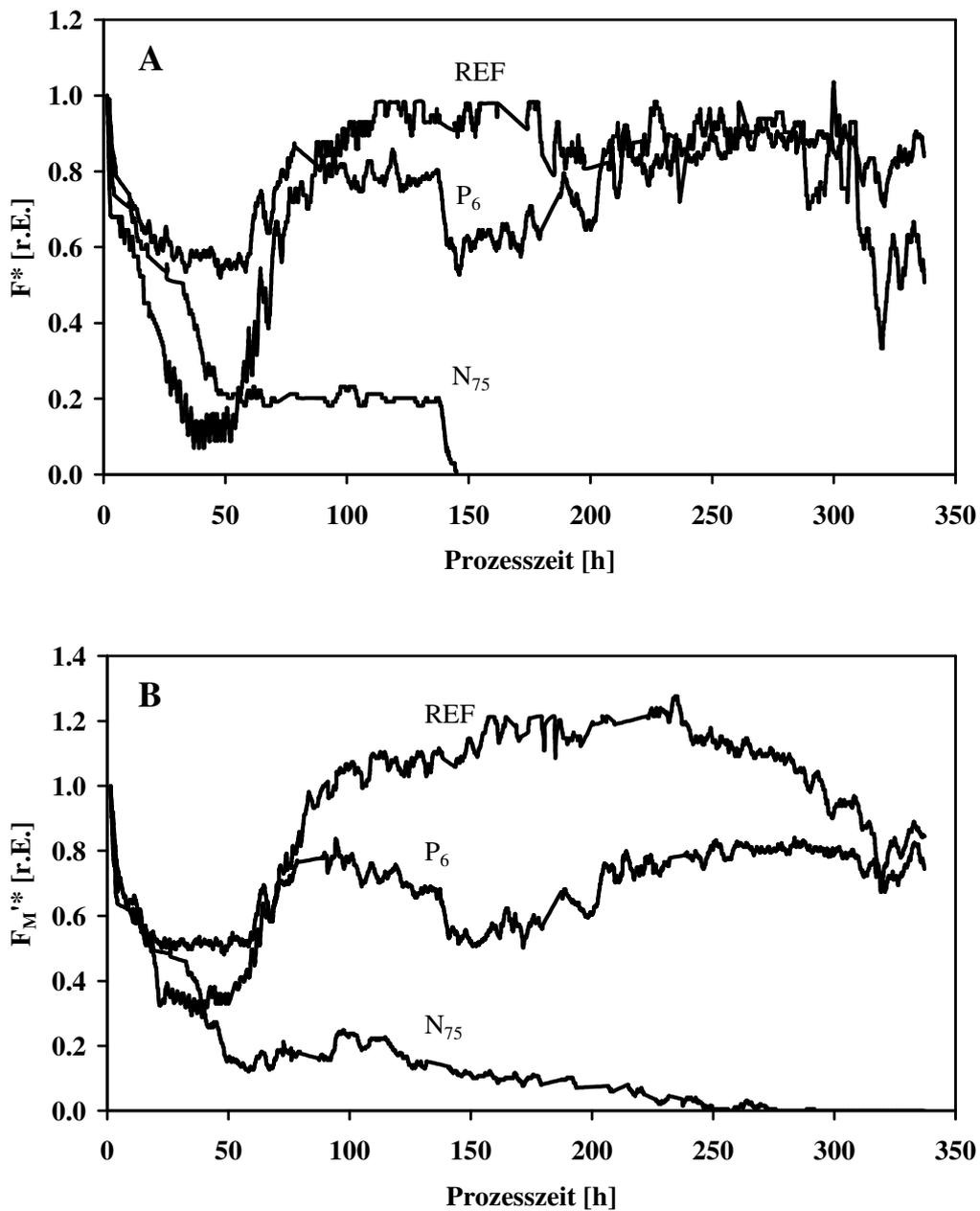


Abb. 3.2.3. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) (* normiert) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (♦) REF; (□) N_{75} ; (▲) P_6

Die höchsten Fluoreszenzsignale wurden in der Referenzkultur innerhalb der Prozesszeit $t = 100$ h bis $t = 180$ h (F, *Abb. 3.2.3. A*) und bis $t = 230$ h (F_M' , *Abb. 3.2.3. B*) gemessen. Nach dieser Zeit fallen die F- und F_M' -Signale wieder ab und lagen nach 350 h um 10 % niedriger als die Startwerte. Die höchsten Werte der Fluoreszenzsignale F und F_M' wurden in der Kultur P_6 in dem Zeitraum von 100 bis 350 h Prozessstunden gemessen. Innerhalb dieses Prozesszeitraumes kam es in der Zeit von 150 bis 200 h (*Abb. 3.2.3. A, B*) und von 290 bis 350 h (*Abb. 3.2.3. B*) nach Prozessbeginn zu einem vermutlich elektronisch bedingten Absinken der Signale. Davon ausgehend, lagen die Fluoreszenzsignale der Kultur P_6 zum Prozessende um 10 % (F, *Abb. 3.2.3. A*) und um 20 % (F_M' , *Abb. 3.2.3. B*) erniedrigt im Vergleich zu ihren Startwerten vor. Die Fluoreszenzsignale der Kultur N_{75} erholten sich 50 h nach Prozessbeginn nicht mehr. Die geringe Signalstärke konnte beim F-Signal (*Abb. 3.2.3. A*) noch bis 140 h und beim F_M' -Signal (*Abb. 3.2.3. B*) bis 250 h gemessen werden. Danach war aufgrund ungenügender Sensitivität der Detektoren keine sinnvolle Signalerfassung mehr möglich.

Aus den Ergebnissen der *inline*-Fluoreszenzmessungen ging deutlich hervor, dass die Nitratlimitierung wie auch die Phosphatlimitierung in der Anpassungsphase zu einer größeren Abnahme der F- und F_M' -Signale führten als die Signale der Referenz. Zum Prozessende hingegen hatte lediglich ein limitiertes Nitratangebot eindeutig von der Referenz abweichende, Auswirkungen auf die Fluoreszenzsignale

Der zeitliche Verlauf der nach *Gleichung 2.1. (Kap. 2.3.1.)* ermittelten photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} ist in *Abb. 3.2.4.* zu sehen.

Die Startwerte lagen in einem Bereich von 0.45 r.E. (N_{75} , P_6) und 0.66 r.E. (REF). Innerhalb von 24 h bis 50 h nach Prozessstart stiegen die ϕ_{PSII} -Werte in der Referenzkultur auf 0.9 r.E. an und fielen wieder bis $t = 75$ h auf den Anfangswert zurück. Nach 350 h war der ϕ_{PSII} -Wert in der Referenzkultur um 16 % im Vergleich zu seinem Startwert leicht angestiegen. In den nitrat- und phosphatlimitierten Kulturen N_{75} und P_6 dagegen verliefen die ϕ_{PSII} -Werte in den ersten 75 h konstant und während diese in der Kultur P_6 bis zum Prozessende weiterhin konstante Werte hervorbrachten, brach die Ermittlung der ϕ_{PSII} -Werte in der Kultur N_{75} aufgrund fehlender F-Signale (*Abb. 3.2.4. A*) nach 140 h ab.

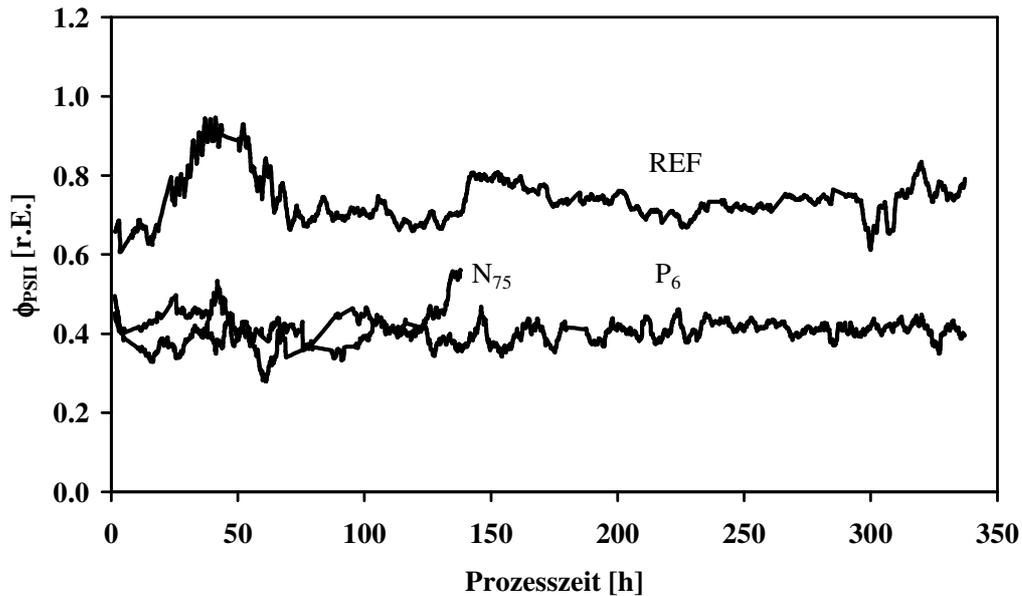


Abb. 3.2.4. Zeitlicher Verlauf der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C, ermittelt aus den inline gemessenen Fluoreszenzsignalen F und F_M' (Abb. 3.2.3.). (♦) REF; (□) N_{75} ; (▲) P_6

3.2.2. Biologische Trockenmasse (BTM)

Die biologische Trockenmasse (BTM) wurde entsprechend vorliegendem Protokoll (Kap. 2.3.3.) bestimmt. Alle gemessenen Konzentrationen an Fettsäuren, Pigmenten, α -Tocopherol und Nährstoffen in Kap. 3.2. wurden auf diese BTM-Werte bezogen.

Die Abb. 3.2.5. zeigt BTM-Messungen der drei Kulturen (REF, N_{75} , P_6) mit unterschiedlichem Nitrat- bzw. Phosphatangebot im Medium.

Es konnte festgestellt werden, dass es kaum Änderungen in der BTM während des gesamten Prozesszeitraumes gab. In Tab. 3.2.3. sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Kulturen (s.o.) bei 17 °C aufgelistet.

Die Abweichungen der BTM in Abb. 3.2.5. liegen innerhalb eines Kulturexperimentes (350 h) bei 10.4 % (REF), 16.2 % (N_{75}) und 7.5 % (P_6). Die durchschnittlichen Biomassekonzentrationen wurden mit 0.175 g BTM L⁻¹ (P_6) – 0.182 g BTM L⁻¹ (REF, N_{75}) gemessen. Aufgrund der relativ geringen und annähernd konstanten BTM wurde eine Minimierung der Selbstbeschattung erreicht und Licht konnte als Einflussgröße ausgeschlossen werden, da sich das Licht/ Zelle-Verhältnis kaum ändert.

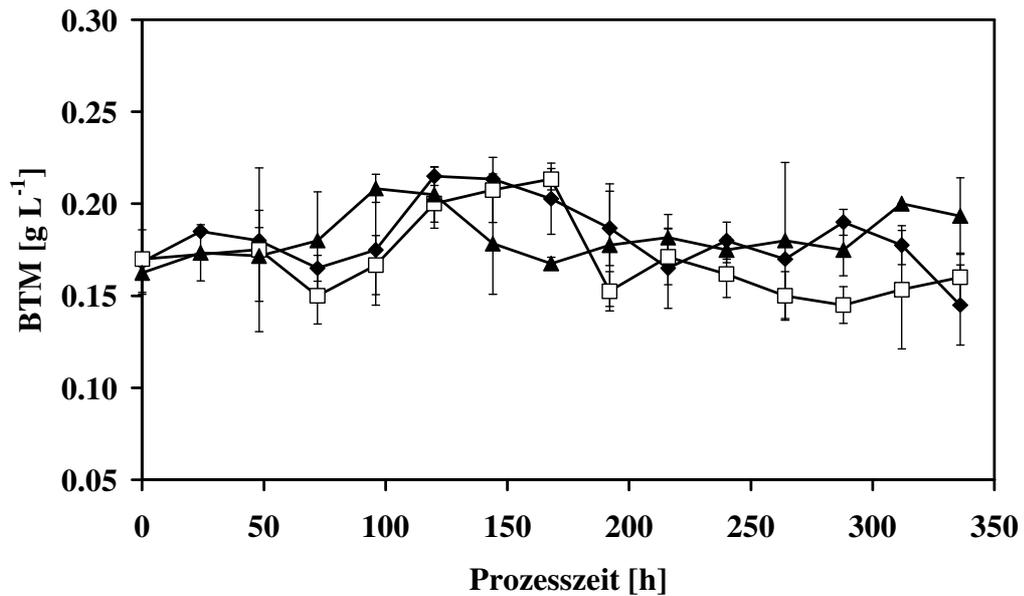


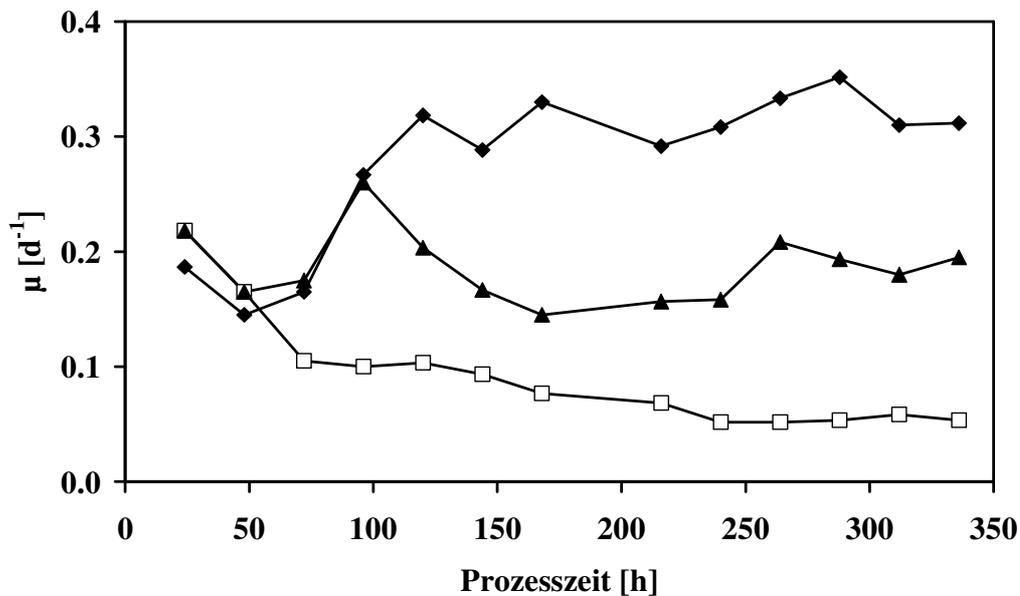
Abb. 3.2.5. Zeitlicher Verlauf der biologischen Trockenmasse (BTM) [g L⁻¹] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (◆) REF; (□) N₇₅ und (▲) P₆

Tab. 3.2.3. Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte (3 d⁻¹) und Standardabweichungen der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten.

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μmol L ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [μmol L ⁻¹]	BTM [g L ⁻¹]
N ₇₅	75	90	0.182 ± 0.017
P ₆	1800	6	0.175 ± 0.015
REF	1800	90	0.182 ± 0.013
Mittelwert			0.179 ± 0.015
Abweichung [%]			8.4

3.2.3. Wachstumsrate (μ)

Die aus dem Pumpvolumen ermittelten zeitlichen Verläufe der Wachstumsraten (*Gleichung 2.2., Kap. 2.3.4.*) der Kulturexperimente bei 17 °C sind in *Abb. 3.2.6.* über einen Zeitraum von 350 h dargestellt.



*Abb. 3.2.6. Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten μ [d⁻¹] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (♦) REF; (□) N₇₅ und (▲) P₆*

Die Anpassung an neue Wachstumsparameter wie z.B. Licht- und Nährstoffangebot, Temperatur und pH-Wert in den ersten 100 h des Reaktorprozesses wurde gekennzeichnet durch eine Abnahme der Wachstumsrate bis zu einer Prozesszeit von 50 bis 70 h, um 20 % (REF, P₆) und um 50 % (N₇₅). Die Wachstumsraten der Referenzkultur und der Kultur P₆ stiegen anschließend bis 100 – 120 h wieder an, wohingegen die Kultur N₇₅ gering, aber stetig bis zum Prozessende abnahm. Eine dynamische Absenkung von μ war in der Kultur P₆ von 100 bis 170 h nach Prozessbeginn zu beobachten. Danach blieb μ in dieser Kultur konstant und nach 250 Prozessstunden nahm μ wieder zu.

Zum Prozessende konnte festgestellt werden, dass die Phosphatlimitierung (P₆) eine Abnahme der Wachstumsrate um 42 % und die Nitratlimitierung (N₇₅) eine Abnahme um 83 % gegenüber der Wachstumsrate der Referenzkultur bewirkte (*Tab. 3.2.4.*).

Tab. 3.2.4. Wachstumsraten von *N. salina* Kulturen nach 350 h unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C mit unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μmol L ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [μmol L ⁻¹]	μ [d ⁻¹]
N ₇₅	1800	90	0.324
P ₆	75	90	0.055
REF	1800	6	0.189

3.2.4. Pigmente

In diesem Kapitel werden die zeitlichen Verläufe der Pigmentanalysen der Kulturexperimente bei verschiedenen Nitrat- und Phosphatangeboten und einer Kultivierungstemperatur von 17 °C präsentiert. Die Pigmentanalyse wurde wie unter 3.3.6. beschrieben durchgeführt. Daraus resultierende Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in mg g⁻¹ angegeben.

Der zeitliche Verlauf der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucherixanthin (Vaux), Zeaxanthin (Zx) und β-Karotin ist in Abb. 3.2.7. dargestellt. Im Wesentlichen entsprechen die Verläufe der Pigmente Vx, Vaux, Zx und β-Karotin (Abb. 3.2.7. B - E) dem Verlauf der Chl_a-Konzentration (Abb. 3.2.7.A).

Die Umstellung auf neue Wachstumsparameter führte in allen Kulturexperimenten bei 17 °C, also in der Referenzkultur (REF), in der nitratreduzierten Kultur (N₇₅) und in der phosphatreduzierten Kultur (P₆) zu einer Abnahme der Chl_a-Gehaltes um 30 % (REF) bis 55 % (P₆, N₇₅) (Abb. 3.2.7.A) in den ersten 24 bis 50 h. Dieser Effekt, mit äquivalenten Werten, konnte ebenfalls in den zeitlichen Verläufen der Pigmente Vx, Vaux, Zx und β-Karotin (Abb. 3.2.7. B – E) nachgewiesen werden. Die gesamte Adaptionszeit erstreckte sich nach Prozessbeginn über einen Prozesszeitraum von ca. 75 h.

Im Anschluss an die Adaptionsphase nahmen die Pigmentkonzentrationen in der Kultur N₇₅ stetig bis zum Prozessende ab, die Pigmentkonzentrationen der Kultur P₆ und der Referenzkultur blieben dagegen konstant. Nach 350 h lagen die Chl_a-Konzentrationen der Kultur P₆ um 30 %, im Vergleich zur Chl_a-Konzentration der Referenzkultur, verringert vor (Tab. 3.2.5.). Die Endwerte der Vx-, Vaux-, Zx- und β-Karotinkonzentration der Kultur P₆

verringerten sich gegenüber den Endwerten der Referenzkultur um weniger als 20 % bis 30 % (Tab. 3.2.5.).

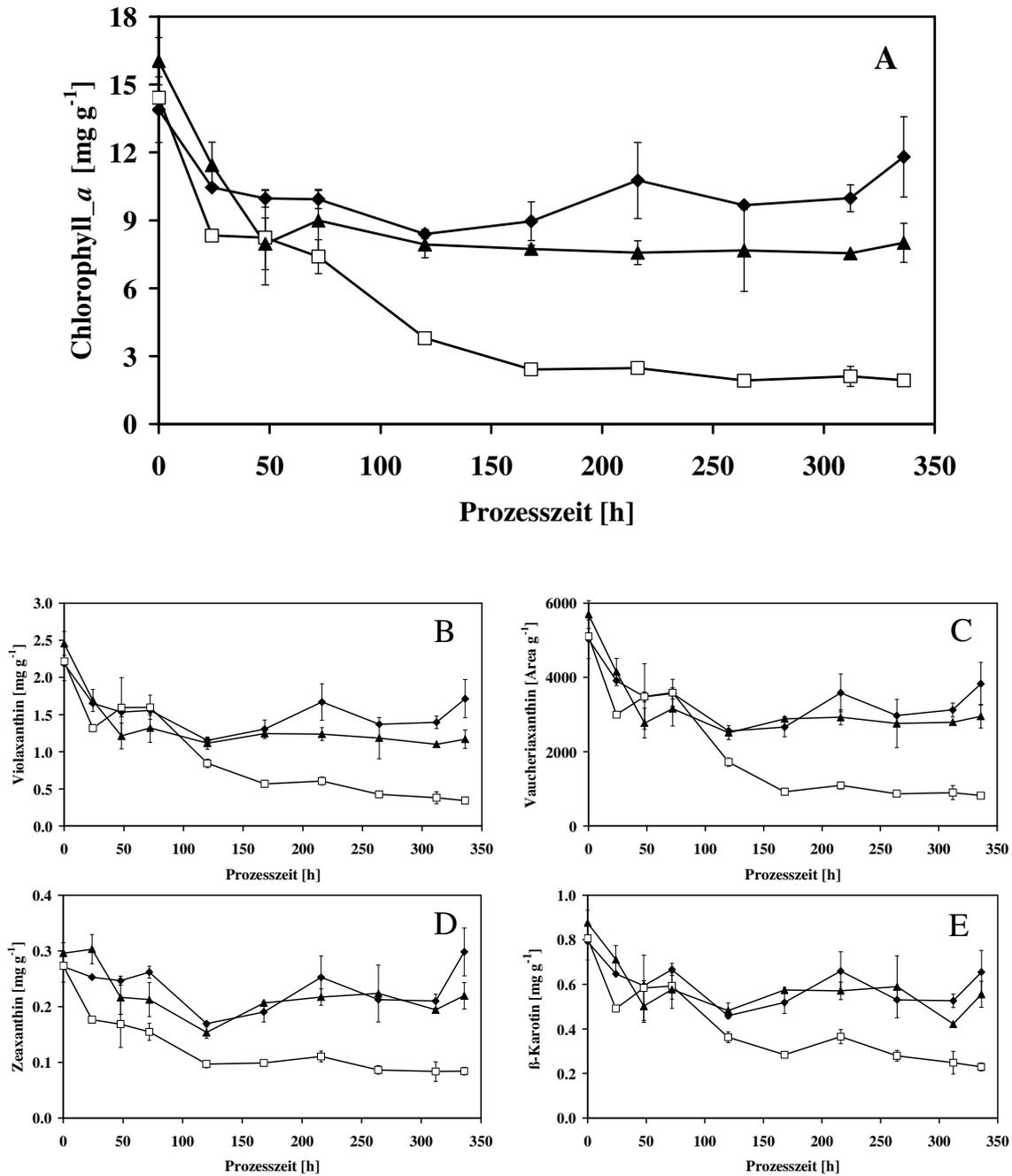


Abb. 3.2.7. Zeitliche Verläufe unterschiedlicher Pigmente von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. Auf die BTM bezogen in [mg g⁻¹] bzw. [Area g⁻¹]: (A) Chlorophyll_a; (B) Violaxanthin; (C) Vaucherixanthin; (D) Zeaxanthin und (E) β-Karotin. (◆) REF; (□) N75; (▲) P6

Tab. 3.2.5. Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), Vaucheriaxanthin (Vaux), β -Karotin (β -Kar) und Zeaxanthin (Zx) der Versuche bei 17 °C und unterschiedlichen N- und P-Angeboten. Angegeben sind die Mittelwerte der letzten beiden Prozesstage mit ihren Standardabweichungen (n=6). Alle Pigmente wurden auf die BTM [mg g^{-1}] bezogen.

$\mu^* = \mu\text{mol L}^{-1}$

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μ^*]	PO ₄ ³⁻ [μ^*]	Chl _a [mg g^{-1}]	Vx [mg g^{-1}]	β -Kar [mg g^{-1}]	Zx [mg g^{-1}]	Vaux [Area g^{-1}]
REF	1800	90	10.88 ± 1.29	1.56 ± 0.22	0.59 ± 0.09	0.25 ± 0.06	3480 ± 500
N ₇₅	75	90	2.02 ± 1.20	0.36 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.08 ± 0.00	860 ± 60
P ₆	1800	6	7.78 ± 3.30	1.14 ± 0.05	0.49 ± 0.09	0.21 ± 0.02	2880 ± 110

Daraus folgend hatte limitiertes Phosphatangebot (P₆) bei 17 °C einen stärkeren Einfluss auf die Chl_a- und Vx-Konzentration (Abb. 3.2.7. A und B) von *N. salina* als auf die Pigmente Vaux, Zx und β -Karotin (Abb. 3.2.7. C – E), bei denen der Einfluss eines limitierten Phosphatangebotes nur schwach ausgeprägt war.

Einen erheblich größeren Einfluss auf alle analysierten Pigmente hatte dagegen ein limitiertes Nitratangebot in der Kultur N₇₅ bei 17 °C. In dieser lagen die Endwerte der Chl_a-, Vx- und Vaux-Konzentrationen um 80 % und die der β -Kerotin und Zx-Konzentration um 60 bis 70 %, niedriger als die der Referenzkultur vor (Tab. 3.2.5.).

3.2.5. α -Tocopherol

Die Durchführung der Analyse der α -Tocopherolkonzentrationen in *N. salina* wurde in Kapitel 3.3.7. beschrieben. Die resultierenden Konzentrationen von α -Tocopherol wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und in $\mu\text{g g}^{-1}$ angegeben.

In Abb. 3.2.8. lagen die Startwerte in den Kulturen der Experimente mit einer Kultivierungstemperatur von 17 °C in einem Bereich um 1500 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Die Anpassungsphase der Referenzkultur (REF) und der phosphatreduzierten Kultur (P₆) war gekennzeichnet durch ein deutliches Absinken der α -Tocopherolkonzentration in dem Prozesszeitraum bis 120 h nach Prozessbeginn auf 400 $\mu\text{g g}^{-1}$.

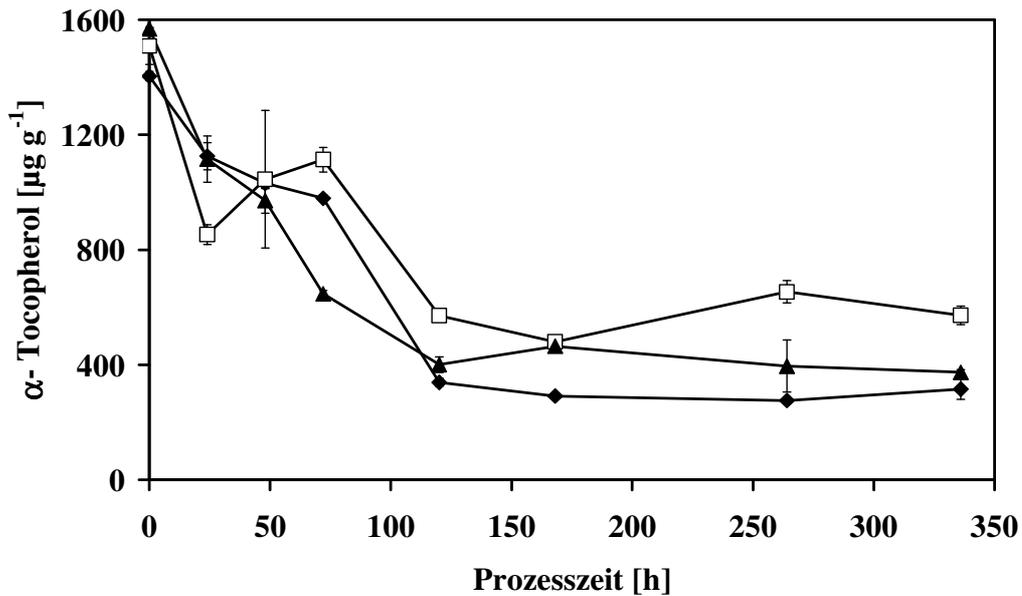


Abb. 3.2.8. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene α -Tocopherolkonzentration [$\mu\text{g g}^{-1}$] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (◆) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

Im zeitlichen Verlauf der nitratreduzierten Kultur (N₇₅) gab es ebenfalls eine Phase der Adaption. In dieser sank die α -Tocopherolkonzentration bis 24 h nach Prozessbeginn auf 850 $\mu\text{g g}^{-1}$ ab und stieg in den folgenden 50 h auf 1100 $\mu\text{g g}^{-1}$ wieder an. Nach einem erneuten Absinken der α -Tocopherolwerte (N₇₅) bis 120 h nach Prozessbeginn auf 570 $\mu\text{g g}^{-1}$ war die Anpassungsphase auch in der Kultur N₇₅ abgeschlossen. Im Anschluss an die Anpassungsphasen der Referenzkultur, der Kultur P₆ und N₇₅ sind dann bis zum Prozessende konstante α -Tocopherolkonzentrationen in allen drei Experimenten (Abb. 3.2.8.) gemessen worden. Nach 350 h unterschieden sich die Endwerte der Referenzkultur mit 316 (\pm 36) $\mu\text{g g}^{-1}$ und der Kultur P₆ mit 374 (\pm 10) $\mu\text{g g}^{-1}$ nur unwesentlich. Einen signifikanten Einfluss auf die α -Tocopherolkonzentrationen hat, im Vergleich zum Vollmedium (REF), eine Nitratlimitierung im Medium, bei einer Kultivierungstemperatur von 17 °C. Unter diesen Bedingungen produzierte die *N. salina*-Kultur N₇₅ nach 350 h 82 % mehr α -Tocopherol als die Referenzkultur.

3.2.6. Fettsäuren (Fatty Acids, FA)

Die Fettsäureanalyse wurde wie unter 3.3.5. beschrieben durchgeführt. Daraus resultierende Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in % BTM angegeben.

Das Fettsäuremuster in den Kulturen der Reaktorexperimente bei 17 °C zeigte mit den hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Palmitolensäure (C16:1), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1 ω 9), Linolsäure (C18:2 ω 6), Arachidonsäure (C20:4 ω 6) und Eicosapentaensäure (C20:5 ω 3) ein für *N. salina* typisches Muster. Dieses Fettsäuremuster wurde ebenfalls in den Kulturen der Reaktorexperimente bei 21 °C (Kap. 3.1.6.) analysiert.

3.2.6.1. Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acid, TFA)

Die aus der Fettsäureanalyse resultierenden Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in % TFA [w/w BTM] angegeben.

Der zeitliche Verlauf der ermittelten Gesamtfettsäurekonzentration TFA (Summe aller analysierten Fettsäurekonzentrationen), der Kulturexperimente bei 17 °C, ist in Abb. 3.2.9. dargestellt.

Die Startwerte der Referenzkultur, der phosphat- (P₆) und nitratlimitierten Kultur (N₇₅) lagen bei 38 % TFA. Von den drei untersuchten Kulturen zeigte lediglich die Kultur N₇₅ eine ausgeprägte Adaptionphase. Diese reagierte in den ersten 75 h auf die neuen Kultivierungsparameter mit einer Abnahme der TFA-Konzentration auf 30 % TFA, 24 h nach Prozessbeginn und einer schnellen und deutlichen Zunahme der TFA-Konzentration auf 53 % TFA in den anschließenden 50 h. Die Referenzkultur und die Kultur P₆ zeigten während der ersten 75 h nur geringfügige Veränderungen bezüglich der TFA-Konzentrationen. In diesen beiden Kulturen war keine Adaptionphase zu erkennen. Die über die gesamte Prozesszeit von 350 h gemittelten Werte ergaben mit 35.4 (\pm 5.3) % für die Referenzkultur und mit 38.6 (\pm 2.7) % für die Kultur P₆ einen konstanten zeitlichen Verlauf der beiden Kulturen.

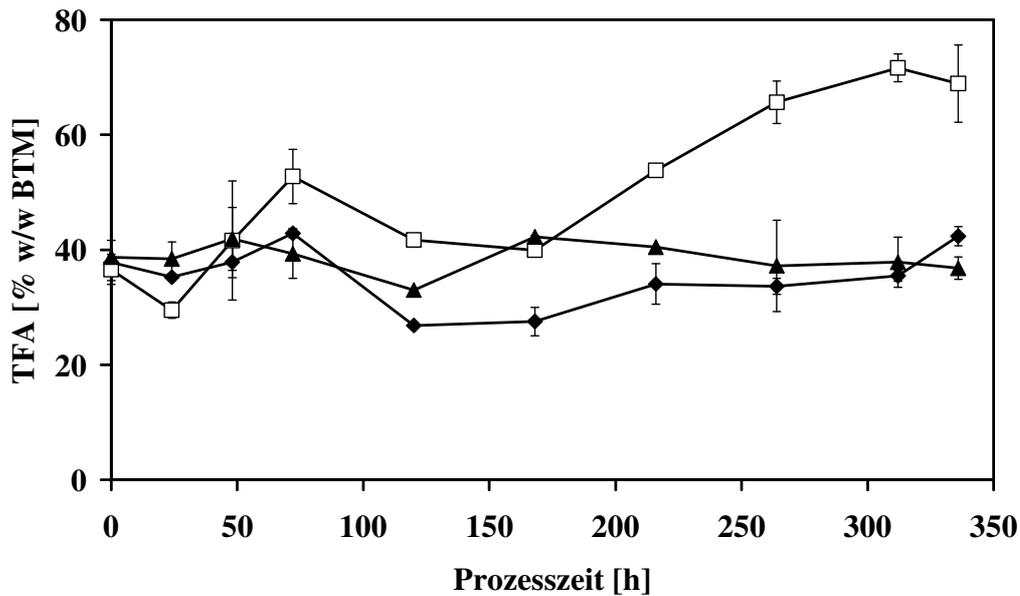


Abb. 3.2.9. Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (♦) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

Nach einer Prozesszeit von 350 h produzierten die Referenzkultur und die Kultur P₆ mit 42 % und 37 % TFA annähernd gleiche Konzentrationen. Der Mittelwert (n = 4) aus den beiden letzten Prozesstagen ergab jedoch übereinstimmende TFA-Konzentrationen der beiden Kulturen (Tab. 3.2.6.).

Tab. 3.2.6. Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) nach 350 h der Experimente bei 17 °C. Die TFA-Werte sind auf die BTM [% BTM] und die EPA-Werte sind auf BTM [% BTM], auf TFA [% TFA] und auf PUFA (poly unsaturated fatty acid) [% PUFA] bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=4) der letzten beiden Prozesstage mit ihren Standardabweichungen. $\mu^* = \mu\text{mol L}^{-1}$

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μ^*]	PO ₄ ³⁻ [μ^*]	TFA [% BTM]	EPA [% BTM]	EPA [% TFA]	EPA [% PUFA]
N ₇₅	1800	90	70.36 ± 0.24	2.34 ± 0.03	3.33 ± 0.06	57.64 ± 3.04
P ₆	75	90	37.47 ± 0.22	1.87 ± 0.00	4.98 ± 0.04	59.48 ± 0.58
REF	1800	6	39.36 ± 3.35	3.49 ± 0.17	8.87 ± 0.33	70.84 ± 1.19

Eine eindeutige Zunahme der TFA-Konzentration fand in der nitratlimitierten Kultur N₇₅ statt. In dieser *N. salina*-Kultur wurden mit 70 % TFA [% BTM], im Vergleich zur Referenzkultur, eine um 67 % erhöhte TFA-Konzentration produziert. Mit diesem Ergebnis wurde der Einfluss einer starken Nitratlimitierung bei einer Kultivierungstemperatur von 17 °C im turbidostatischen Prozess auf die TFA-Konzentration von *N. salina* deutlich. Eine starke Phosphatlimitierung hatte dagegen keinen Einfluss auf die TFA-Produktion bei gleichen Prozessbedingungen.

3.2.6.2. Eicosapentaensäure (EPA, C_{20:5}ω₃)

Die gesonderte Darstellung der Fettsäure EPA ist begründet durch den hohen Anteil, den diese an den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in *N. salina* hat. Generell stellt EPA in dieser Mikroalge den Hauptanteil an den PUFA's dar. In den Kulturen mit der Wachstumstemperatur von 17 °C kam diese Fettsäure, bezogen auf die PUFA's, mit 71 % (REF), mit 60 % (P₆) und mit 58 % (N₇₅), zum Ende des Prozesses nach 350 h vor (Tab. 3.2.6. EPA [% PUFA]).

3.2.6.2.1. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration

Die aus der Fettsäureanalyse resultierenden EPA-Konzentrationen wurden auf die biologische Trockenmasse (BTM) bezogen und werden in % EPA [w/w BTM] angegeben.

In Abb. 3.2.10. ist der prozentuale Anteil von EPA zur BTM in einem zeitlichen Verlauf dargestellt.

Die Startwerte der Referenzkultur, der phosphatlimitierten Kultur P₆ und der nitratlimitierten Kultur N₇₅ waren einheitlich und beliefen sich auf eine Konzentration von 2.3 % EPA. Innerhalb der Adaptionzeit, in den ersten 75 h nach Prozessbeginn, nahm der Anteil von EPA in den drei Kulturen zu. Nach einem leichten Abfall, bis zu der Prozesszeit von 120 h, zeigten die phosphat- und nitratlimitierten Kulturen P₆ und N₇₅ konstante Werte bis zum Prozessende. Der Anteil von EPA an der BTM in der Referenzkultur stieg nach dieser Zeit (t=120 h) bis zum Prozessende an und erreichte nach 350 h sein Maximum mit 3.8 % EPA. Die Werte der Kulturen P₆ (1.9 % EPA) und N₇₅ (2.3 % EPA) (Tab. 3.2.6.) am Ende des

Prozesses zeigten, dass eine Phosphat bzw. Nitratlimitierung im Medium, einen negativen Effekt auf den Anteil von EPA an der BTM hatte, denn in der Gegenüberstellung mit den EPA-Werten der Referenzkultur nahm der Anteil von EPA um 46 % (P₆) und um 34 % (N₇₅) ab.

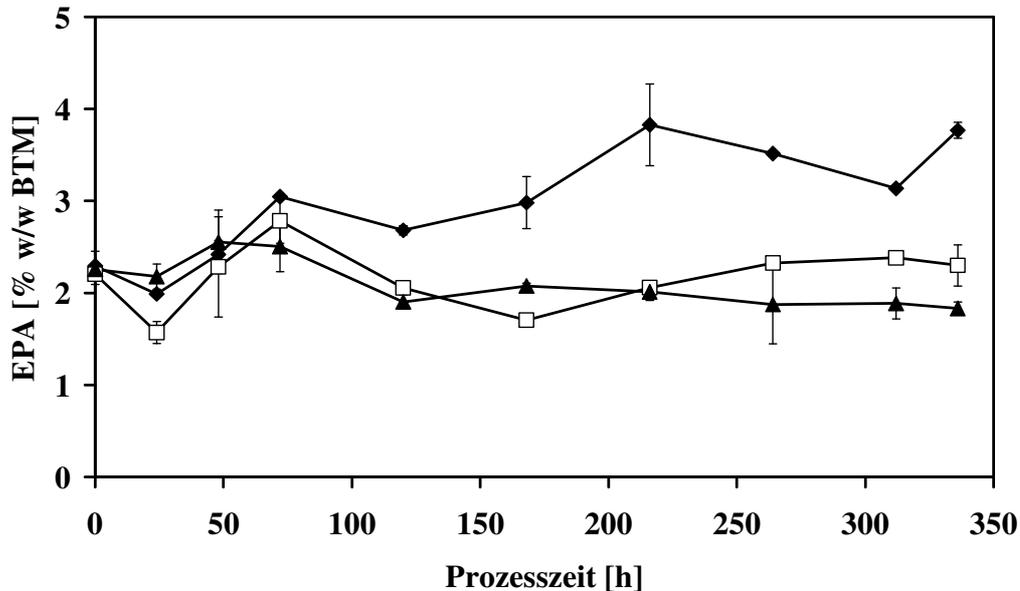


Abb. 3.2.10. Zeitlicher Verlauf der der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (◆) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

3.2.6.2.2. Einfluss von Nitrat und Phosphat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration

Die aus der Fettsäureanalyse resultierenden EPA-Konzentrationen wurden in diesem Kapitel auf die Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) bezogen und werden in % EPA [w/w TFA] angegeben. Der zeitliche Verlauf von EPA [% TFA], der Kulturexperimente bei 17 °C, ist in Abb. 3.2.11. dargestellt.

Zu Beginn des Prozesses belief sich der Anteil bei allen drei Kulturen auf einheitliche 6 % EPA. In der nitratlimitierten Kultur N₇₅ nahm EPA [% TFA] im weiteren Verlauf kontinuierlich ab und erreichte nach 350 h einen Wert von 3.3 %. Nahezu konstant zeigte sich EPA [% TFA] im zeitlichen Verlauf der phosphatlimitierten Kultur P₆. Diese Kultur hatte

zum Ende des Prozesses einen EPA-Anteil von 5.0 %. Lediglich in der Referenzkultur stieg, über eine Prozesszeit von 220 h, EPA [% TFA] auf einen maximalen Wert von 11.4 %. Anschließend sank dieser auf 8.9 % EPA bis zum Prozessende ab.

Ein hoher Mangel an Phosphat und Nitrat ließ EPA [% TFA] in den *N. salina*-Kulturen P₆ und N₇₅ um 44 % und 63 % gegenüber der Referenzkultur (Vollmedium) absinken.

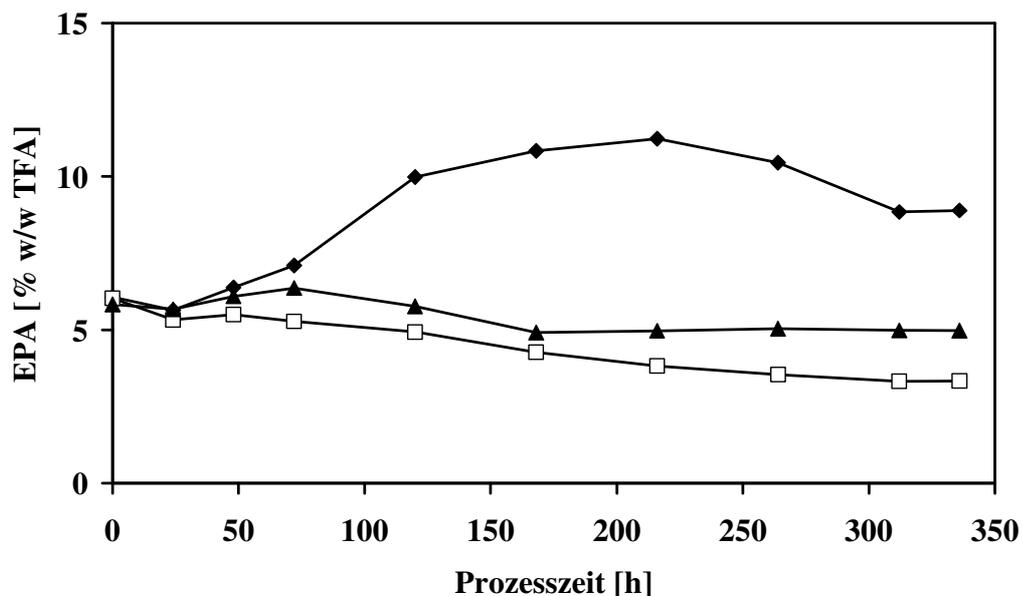


Abb. 3.2.11. Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w TFA] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (◆) REF; (□) N75; (▲) P6

3.2.7. Nährstoffe

3.2.7.1 Intra- und extrazelluläre Stickstoffkonzentrationen in Kulturen mit unterschiedlichem Nitratangebot in den Reservoiren

Die intra- und extrazelluläre Stickstoffkonzentration (C_{Nintra} , C_{Nextra}) der Kulturen sind in Abb. 3.2.12. dargestellt.

Die intrazellulären Stickstoffkonzentrationen zu Beginn des Prozesses der Referenzkultur, der phosphatlimitierten (P₆) und der nitratlimitierten Kultur (N₇₅) lagen in einem Bereich zwischen 40 und 50 mg [g BTM]⁻¹ (Abb. 3.2.12. A). In diesem Wertebereich verliefen die

intrazellulären Stickstoffwerte der Referenzkultur und die Kultur P₆ über die gesamte Prozesszeit. Die Kultur N₇₅ wies abnehmende Stickstoffkonzentrationen in der Zelle auf und hatte nach 350 h mit 20 mg [g BTM]⁻¹ um 50 % gesunkene Stickstoffkonzentrationen im Vergleich zur Referenzkultur und zur Kultur P₆, welche eine volle Nitratversorgung während des Prozesses hatten.

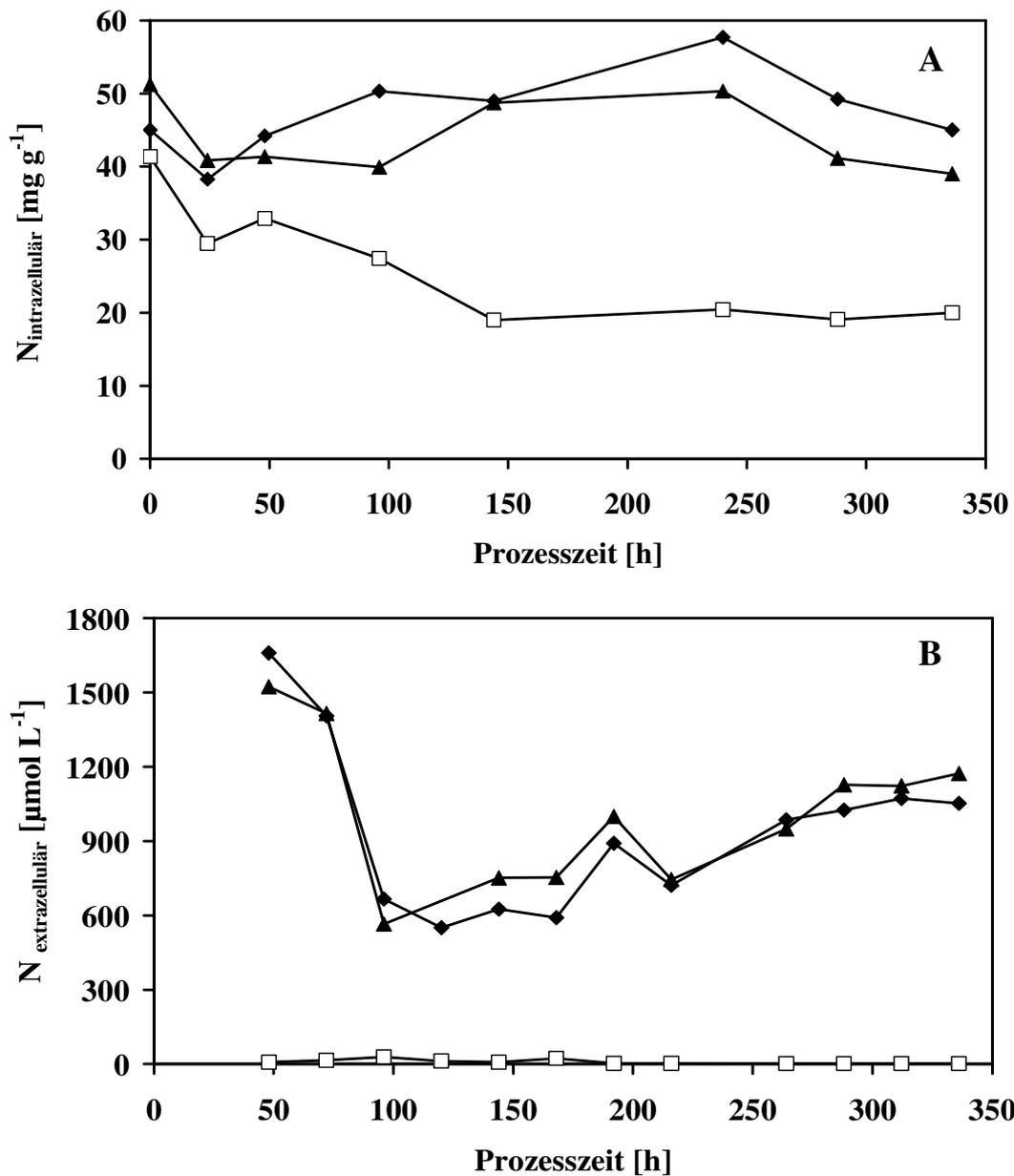


Abb. 3.2.12. (A) Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene intrazelluläre Stickstoffkonzentration C_{Nintra} in [mg g⁻¹] und (B) Zeitlicher Verlauf der extrazellulären Stickstoffkonzentration C_{Nextra} in $\mu\text{mol N L}^{-1}$ von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (◆) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

Die extrazelluläre Stickstoffkonzentration (*Abb. 3.2.12. B*) gibt die quantitative Aufnahme von Stickstoff aus dem Medium wieder. Die ersten Messungen wurden 50 h nach Prozessbeginn durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatte *N. salina* der Kultur N₇₅ bereits den gesamten Stickstoff aus dem Medium aufgenommen, und obwohl in einem turbidostatischen Prozess, je nach Wachstumsrate, Frischmedium in die Reaktoren gepumpt wurde, reichte die Stickstoffkonzentration von 75 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ nicht aus, um den Bedarf an diesem Nährstoff zu decken.

In der Referenzkultur und in der Kultur P₆ (*Abb. 3.2.12. B*) ähnelte sich der zeitliche Verlauf der Konzentrationen an Stickstoff im Medium. Zum Zeitpunkt $t = 100$ h sanken die extrazellulären Stickstoffkonzentrationen der Referenzkultur und der Kultur P₆ auf ein Minimum ($620 \pm 71 \mu\text{mol L}^{-1}$). Im weiteren Prozessverlauf dieser beiden Kulturen stiegen die extrazellulären Konzentrationen an Stickstoff wieder an und lagen nach 350 h zum Prozessende bei $1110 \pm 85 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2.7.2. Intra- und extrazelluläre Phosphatkonzentrationen in Kulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot in den Reservoiren

Der zeitliche Verlauf der intra- und extrazellulären Phosphatkonzentration (C_{Pintra} , C_{Pextra}) der drei Kulturen REF, P₆ und N₇₅ werden in *Abb. 3.2.13.* dargestellt.

Die ersten Messungen, 24 h nach Prozessbeginn, zeigten bereits eine deutliche Abnahme des intrazellulären Phosphats (*Abb. 3.2.13. A*) in der phosphatlimitierten Kultur P₆. Im Vergleich zu den Kulturen REF und N₇₅ sank C_{Pintra} um die Hälfte auf 11 mg $[\text{g BTM}]^{-1}$ ab. In den folgenden 100 Prozessstunden nahmen die Referenzkultur, die Kultur N₇₅ und die Kultur P₆ um 7 bis 8 mg $[\text{g BTM}]^{-1}$ ab. Nach $t = 200$ h stieg C_{Pintra} in allen drei Kulturen wieder an. Die intrazellulären Phosphatkonzentrationen der Referenzkultur und der Kultur N₇₅ lagen nach dieser Zeit im gleichen Wertebereich wie die Ausgangswerte ($19.9 \pm 0.9 \text{ mg } [\text{g BTM}]^{-1}$) und die der Kultur P₆ bei 9 mg $[\text{g BTM}]^{-1}$. In den letzten drei Prozesstagen sank C_{Pintra} in allen drei Kulturen noch einmal ab. Nach 350 h (*Abb. 3.2.13. A*), und einem prinzipiell gleichgerichteten zeitlichen Verlauf, hatten die Referenzkultur und die Kultur N₇₅ einen C_{Pintra} -Wert von $18.3 \pm 0.4 \text{ mg } [\text{g BTM}]^{-1}$. In der Kultur N₇₅ wurde nach 350 h ein Wert von $C_{\text{Pintra}} = 7 \text{ mg } [\text{g BTM}]^{-1}$ gemessen.

Anhand des zeitlichen Verlaufs der extrazellulären Phosphatkonzentration (C_{Pextra}) der Kultu-

ren REF, P₆ und N₇₅ (Abb. 3.2.13. B) konnte festgestellt werden, dass die Phosphatkonzentration im Medium innerhalb der ersten 24 h um 40 μmol L⁻¹ (N₇₅) und 50 μmol L⁻¹ (REF) gesunken ist. In der Kultur P₆ lag keine Änderung bezüglich der Phosphatkonzentration vor.

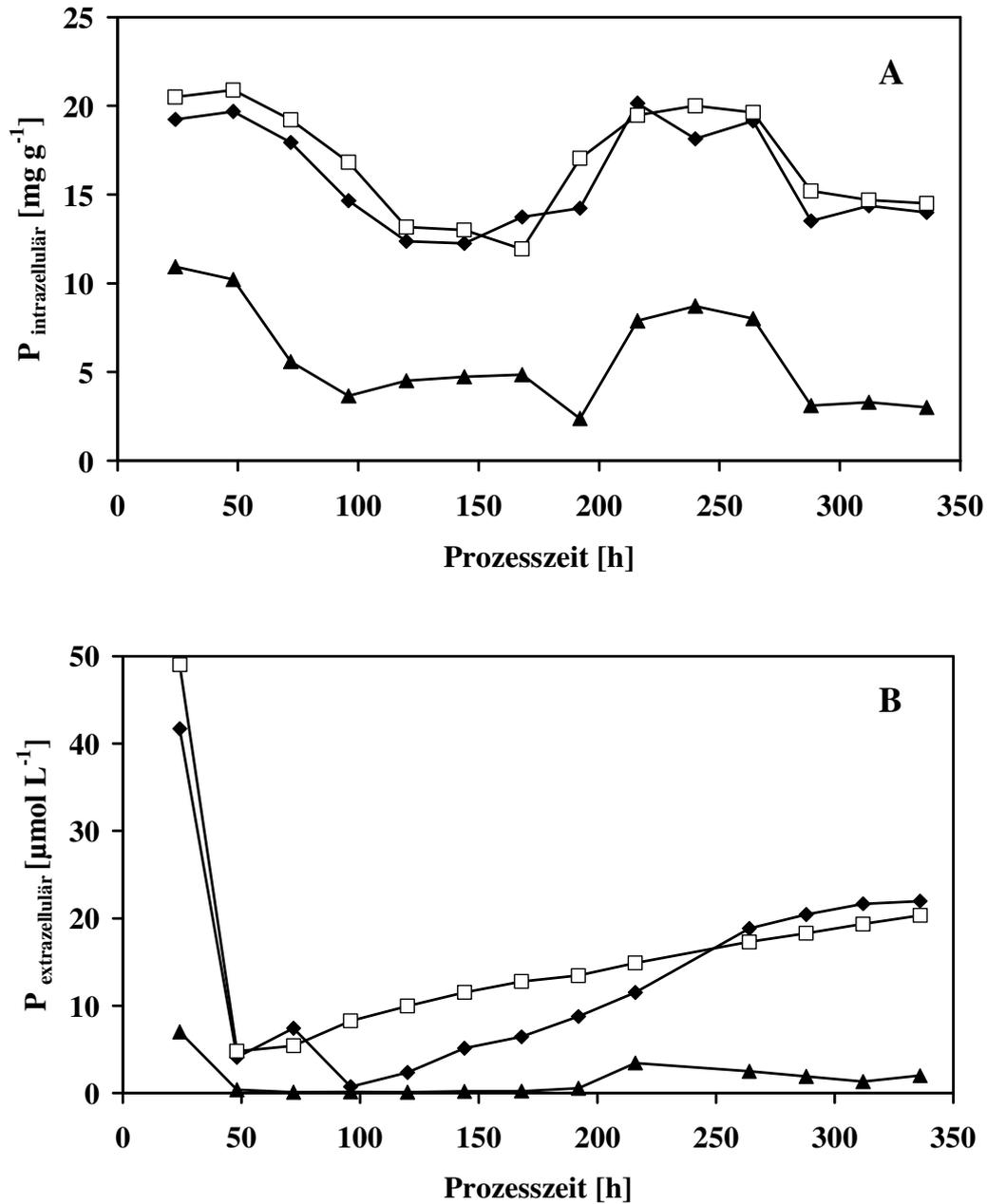


Abb. 3.2.13. (A) Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogenen intrazelluläre Phosphatkonzentration $C_{P_{intra}}$ in [mg g⁻¹] und (B) Zeitlicher Verlauf der extrazellulären Phosphatkonzentration $C_{P_{extra}}$ in μmol N L⁻¹ von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (♦) REF; (□) N₇₅; (▲) P₆

Zum Zeitpunkt $t = 50$ h nach Prozessbeginn wurden in der Referenzkultur und in der Kultur N_{75} nur noch $5 \mu\text{mol}$ Phosphat im Medium gemessen werden. Das bedeutet, dass 96% von $90 \mu\text{mol}$ Phosphat (Ausgangskonzentration in den Reservoiren) aus dem Medium entzogen worden sind. Im weiteren Verlauf (*Abb. 3.2.13. B*) stiegen die Phosphatkonzentrationen der Referenzkultur und der Kultur N_{75} wieder stetig an. Nach 350 h lag die Phosphatkonzentration in diesen beiden Kulturen bei $21.2 \pm 1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Die Kultur P_6 nahm nach $t = 50$ h das gesamte Phosphat aus dem Medium auf und nach $t = 200$ h blieben die Werte unter $3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2.7.3. Intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration und das C/N-Verhältnis

Die intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration (C_{Cintra}) in den Kulturexperimenten bei $17 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde in *Abb. 3.2.14. A* und das aus der intrazellulären Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentration hervorgegangene C/N-Verhältnis wurde in *Abb. 3.2.14. B* dargestellt.

Die Startwerte der Kohlenstoffkonzentrationen (*Abb. 3.2.14. A*) der Kulturen REF, P_6 und N_{75} lagen in einem Bereich zwischen 680 und $780 \text{ mg [g BTM]}^{-1}$. Im weiteren Verlauf zeigten die Kulturen keine zeitliche Entwicklung bezüglich der Kohlenstoffkonzentration bis zum Prozessende. Nach 350 h lagen die Werte der Referenzkultur bei $620 \text{ mg C [g BTM]}^{-1}$, die der Kultur P_6 bei $680 \text{ mg C [g BTM]}^{-1}$ und die der Kultur N_{75} bei $800 \text{ mg C [g BTM]}^{-1}$.

Das C/N-Verhältnis der Kulturen REF, P_6 und N_{75} (*Abb. 3.2.14. B*) hatte zum Prozessbeginn einen Wert von $16.1 \pm 0.7 [-]$. Aus den nahezu übereinstimmenden zeitlichen Verläufen der Stickstoff- (*Abb. 3.2.12. A*) und Kohlenstoffkonzentration (*Abb. 3.2.14. A*) der Referenzkultur und der Kultur P_6 , ergaben sich bei den C/N-Verhältnissen (*Abb. 3.2.14. B*) ebenfalls ähnliche Verläufe und das C/N-Verhältnis blieb über den gesamten Prozesszeitraum konstant. Eine abnehmende intrazelluläre Stickstoffkonzentration in Kultur N_{75} (*Abb. 3.2.12. A*), hervorgerufen durch limitierte Nitratverfügbarkeit im Medium und eine relativ konstante intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration, führte in der Kultur N_{75} zu einer Erhöhung des C/N-Verhältnisses auf $42 [-]$ (*Abb. 3.2.14. B*).

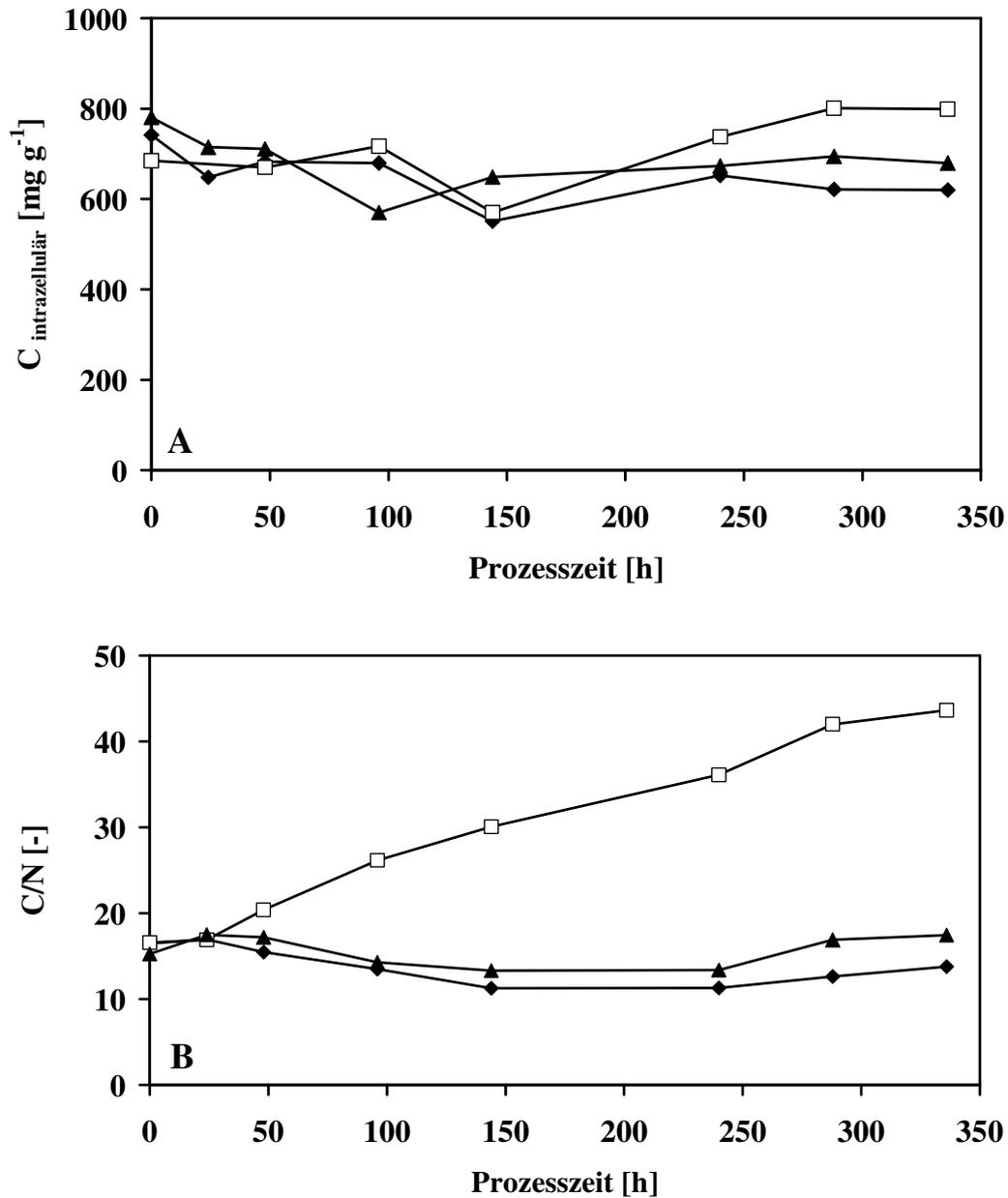


Abb. 3.2.14. (A) Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene intrazelluläre Kohlenstoffkonzentration C_{Cintra} in $mg\ [g\ BTM]^{-1}$ und (B) das C/N-Verhältnis [-] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 17 °C. (\blacklozenge) REF; (\square) N_{75} ; (\blacktriangle) P_6

3.3. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 26 °C mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen in den Reservoiren

In den *Kap. 3.1.* und *3.2.* wurden die Einflüsse verschiedener Nitratangebote auf die Mikroalge *N. salina* bei Temperaturen von 21 °C und 17 °C bereits betrachtet. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Kultivierungsexperimente (N₇₅, N₁₅₀, N₃₀₀, N₆₀₀ und REF) bei 26 °C präsentiert. Von Kultivierungen unter Phosphatmangel wurde abgesehen, da unterschiedliche Phosphatlimitierungen bei 21 °C (*Kap. 3.1.*) nur marginale Abweichungen von der Referenz hervorriefen und daher auch kaum Änderungen bei 26 °C zu erwarten waren.

Ferner werden im folgenden Kapitel weder α -Tocopherol- noch Nährstoffdaten präsentiert. Auch hier waren im Wesentlichen keine neuen Erkenntnisse, zusätzlich zu denen aus *Kap. 3.1.* und *3.2.*, zu erwarten

In den vorhergehenden Prozessen (*Kap. 3.1.*, *3.2.*) wurden die Reaktoren vor dem Prozessstart mit einer Vorkultur *N. salina*'s so bestückt, dass eine OD = 1 vorhanden war. Der turbidostatische Betrieb wurde unmittelbar darauf gestartet.

Bei den 26 °C-Experimenten startete der turbidostatische Prozess indessen zeitversetzt 24 h ($t = 0$) (N₇₅ – N₆₀₀) bzw. 200 h ($t = 0$) (REF) nach Zugabe einer Vorkultur von *N. salina*. Dies begründete sich dadurch, dass die OD zum Zeitpunkt der Bestückung < 1 war und der Mikroalge noch Wachstumszeit gegeben wurde, um den Sollwert von OD = 1 zu erreichen. Dieses Vorgehen hatte den Hintergrund, Adaptionsphasen, die in *Kap. 3.1.*, *3.2.* bereits dokumentiert wurden, zu verhindern und damit diese als Ursache für Änderungen auszuschließen.

3.3.1. Fluoreszenzmessungen

3.3.1.1. Online-Fluoreszenzsignale

Die zeitlichen Verläufe der *online*-Fluoreszenzsignale F und F_M' der nitratlimitierten Kulturen (N₇₅ – N₆₀₀) und *online*-Fluoreszenzsignale der Referenzkultur sind zusammen mit dem zeitlichen Verlauf der photochemischen Effizienz in *Abb. 3.3.1. A – C* zu sehen.

Die ab 170 h nach Prozessbeginn dargestellten Signale wurden nicht normiert wie die *online*-Signale in *Kap. 3.1.1.* und *3.2.1.*

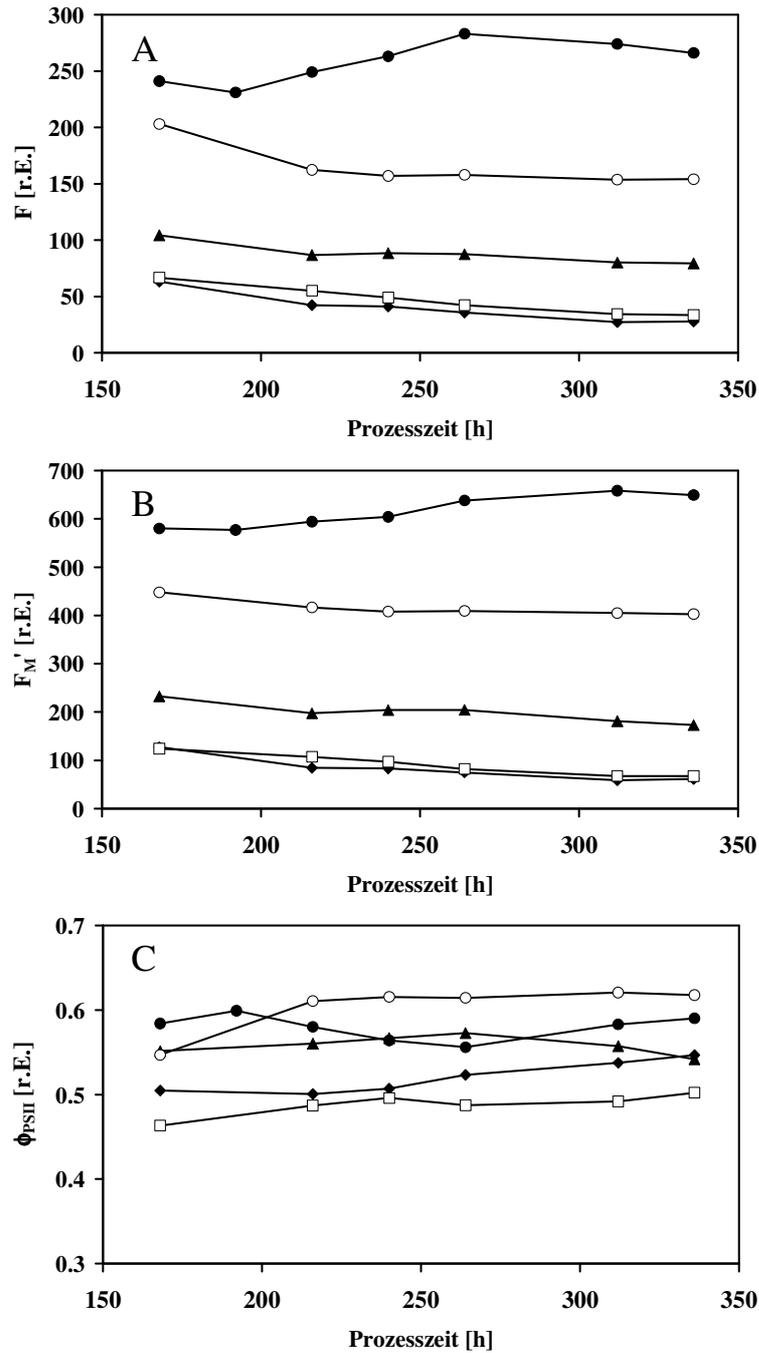


Abb. 3.3.1. Zeitlicher Verlauf der online gemessenen Fluoreszenzsignale F (A) und F_M' (B) und die daraus berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} (C) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirren: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●)Referenz 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Die Fluoreszenzwerte der Nitratexperimente bei 26 °C waren nach 170 h über einen Wertebereich von 50 bis 250 r.E. für die Grundfluoreszenz F (Abb. 3.3.1. A) und von 100 bis fast 700 r.E. für die Maximalfluoreszenz F_M' (Abb. 3.3.1. B) verteilt. Die zu diesem Zeitpunkt erhaltenen Werte verhielten sich anschließend bis zum Prozessende konstant. Der Einfluss einer Nitratlimitierung wurde anhand der, im Vergleich zur Referenzkultur, niedrigen Fluoreszenzsignale sichtbar. Die Signale F und F_M' weichen von den Signalen der Referenzkultur um ca. 40 % (N_{600}) bis ca. 90 % (N_{75} , N_{150}) zum Prozessende nach unten ab. Die aus den F - und F_M' -Werten nach Gleichung 2.1. berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} aller bei 26 °C kultivierten *N. salina*-Kulturen lag mit 0.50 bis 0.62 r.E. in einem relativ engen Bereich (Abb. 3.3.1. C) und ließ keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen differenzierten Einfluss unterschiedlicher Nitratangebote auf die ϕ_{PSII} -Werte zu.

3.3.1.2. Inline-Fluoreszenzsignale

Der zeitliche Verlauf einer kontinuierlichen Erfassung der *inline*-Fluoreszenzsignale F und F_M' der Nitratexperimente bei 26 °C ist zum einen in der Abb. 3.3.2. (REF) und zum anderen in der Abb. 3.3.3. A - C (N_{75} - N_{600}) dargestellt.

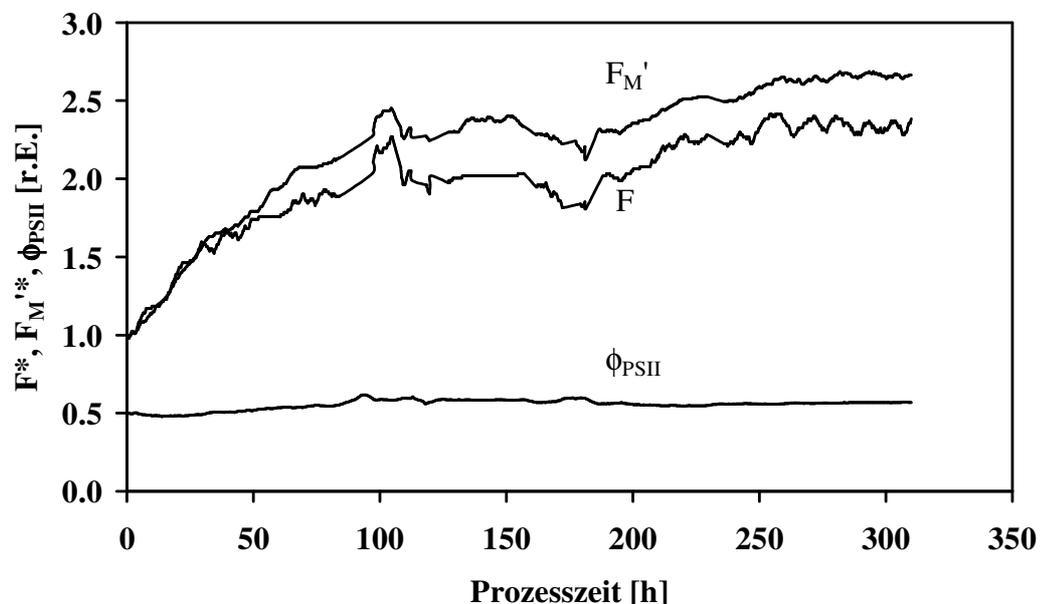


Abb. 3.3.2. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' (* normiert) der Referenzkultur (REF) und der daraus ermittelten photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C.

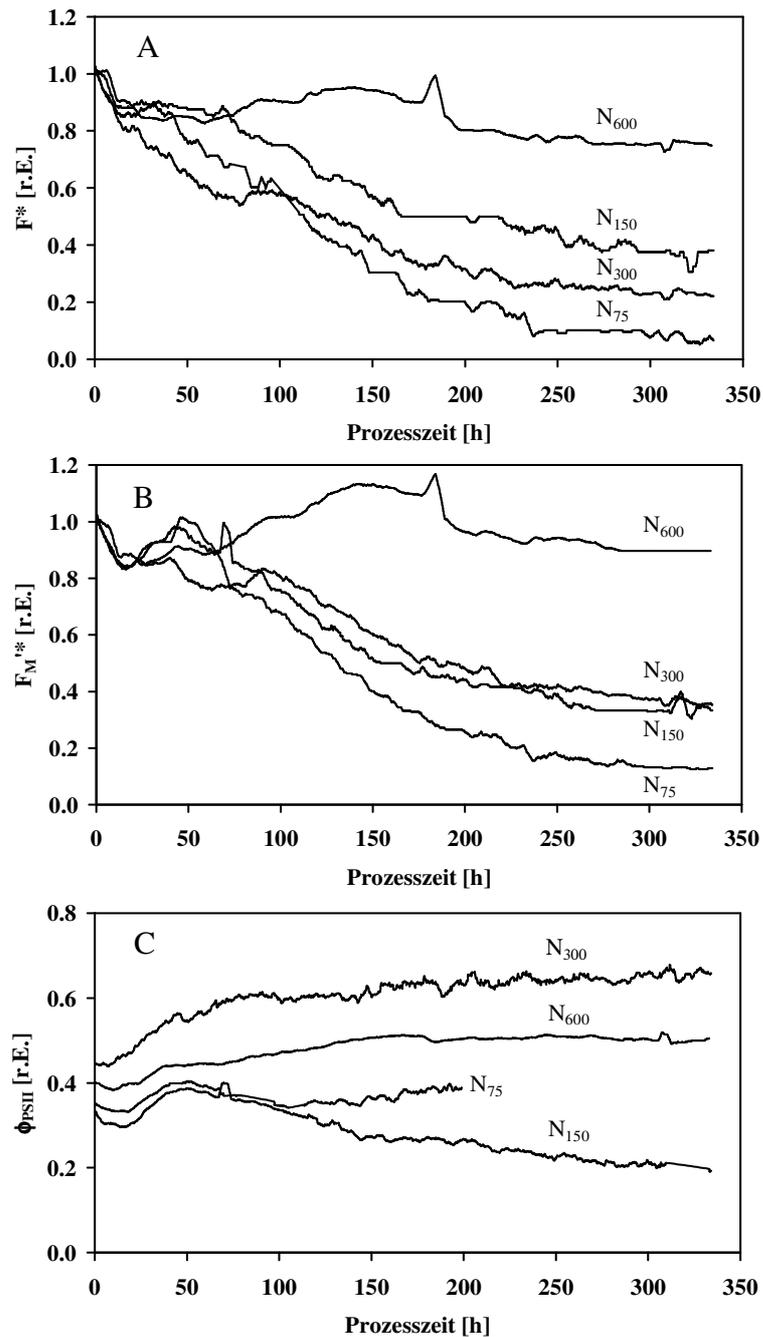


Abb. 3.3.3. Zeitlicher Verlauf der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F^* (A) und $F_M'^*$ (B) (*normiert) und die daraus berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} (C) von *N. salina* unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen in den Medienreservoirien: N_{75} ; N_{150} ; N_{300} ; N_{600}

Alle F- und F_M' -Signale sind auf den jeweiligen zur Kultur gehörigen Startwert normiert worden (Tab. 3.3.1.). Die Normierungen wurden vorgenommen, um Tendenzen erkennbar zu machen

Tab. 3.3.1. Startwerte der inline gemessenen Fluoreszenzsignale F und F_M' zu Beginn des turbidostatischen Prozesses (*normiert siehe Text)

Kultur	F	F_M'
N ₇₅	0.099	0.153
N ₁₅₀	0.83	0.123
N ₃₀₀	0.134	0.243
N ₆₀₀	0.218	0.368
REF	0.030	0.070

Ein klarer Unterschied zu den Signalen der nitratlimitierten Kulturen, welche abnehmende Verläufe über den gesamten Prozesszeitraum hatten, zeigte sich in der Steigerung der Signale F und F_M' in der Referenzkultur.

Die Fluoreszenzsignale aller Kulturen lagen in drei Wertebereichen vor. Mit Werten von 2.4 r.E. (F) bzw. 2.7 r.E. (F_M') wies die Referenzkultur die höchsten Signale auf. In den darunter liegenden Bereich fiel die Kultur N₆₀₀ mit 0.8 r.E. (F) und 0.9 r.E. (F_M'). Die niedrigsten Fluoreszenzsignale wurden in den Kulturen N₇₅-N₃₀₀ mit 0.1 bis 0.4 r.E. gemessen.

Die zeitlichen Verläufe der photochemischen Effizienz der nitratlimitierten Kulturen sind in Abb. 3.3.3. C und die der Referenzkultur in Abb. 3.3.2. zu sehen.

Die photochemische Effizienz der Referenzkultur und der Kultur N₆₀₀ zeigte über die gesamte Prozesszeit konstante Werte und lag nach Prozessende zwischen 0.6 und 0.5 r.E. Nach einem Anstieg der ϕ_{PSII} -Werte der Kultur N₃₀₀ bis zu einer Prozesszeit von 100 h verliefen diese konstant oberhalb der ϕ_{PSII} -Werte der Referenzkultur. Die Endwerte der Kultur N₃₀₀ lagen nach 350 Stunden mit einem Wert von 0.66 r.E. vor. Dieser Verlauf zeigte sich bereits in Kap 3.1.2. in Abb. 3.1.8. A.

Die ϕ_{PSII} -Werte der Kultur N₁₅₀ (Abb. 3.3.3. C) sanken ab einer Prozesszeit von 50 h nach Prozessbeginn bis zum Prozessende auf einen Wert von 0.2 r.E. ab. Auch die ϕ_{PSII} -Werte der Kultur N₇₅ (Abb. 3.3.3. C) nahmen nach 50 Prozessstunden ab. Nach 100 Prozessstunden waren keine verwertbaren F- und F_M' -Signale mehr zu detektieren. Dies war zum einen anhand des Anstieges der ϕ_{PSII} -Werte bis 200 h zu erkennen und zum anderen waren die

Fluoreszenzsignale nach 200 h so gering, dass eine Berechnung der ϕ_{PSII} -Werte nicht mehr verlässlich war.

3.3.2. Biologische Trockenmasse (BTM)

Die biologische Trockenmasse (BTM) wurde entsprechend *Kap. 2.3.3.* bestimmt. Alle gemessenen Konzentrationen an Fettsäuren und Pigmenten in *Kap. 3.3.* wurden auf diese BTM-Werte bezogen.

Die *Abb. 3.3.4.* präsentiert den zeitlichen Verlauf von BTM-Werten der Kulturexperimente, die bei 26 °C und unterschiedlichen Nitratangeboten kultiviert wurden.

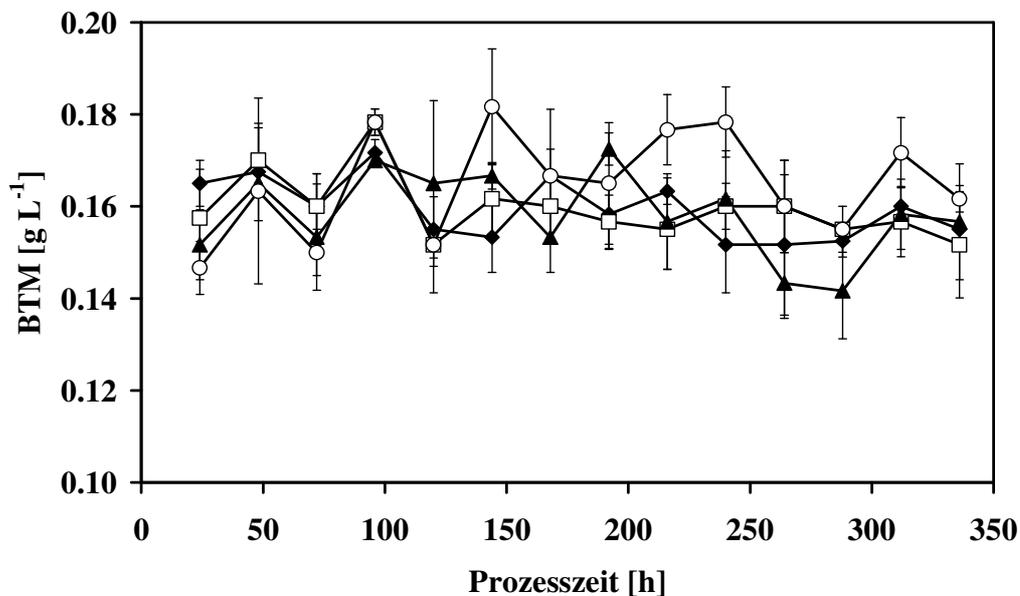


Abb. 3.3.4. Zeitlicher Verlauf der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirten: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600

Die BTM-Werte zeigten keine zeitliche Entwicklung über die gesamte Prozesszeit. Dieses erwartungsgemäße Ergebnis ist auf den turbidostatischen Prozess (*Kap. 2.1.2.2.*) zurückzuführen, in dem die optische Dichte (OD) der Kulturen konstant gehalten wird.

In *Tab. 3.3.2.* sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche bei 26 °C aufgelistet. Die prozentualen Abweichungen der BTM-Werte (*Abb. 3.3.4.*), gemessen über

einen Zeitraum von 350 h (3 d^{-1}), lagen innerhalb eines Kulturexperimentes ($n = 42$) bei 4.1 bis 6.9 %.

Tab. 3.3.2. Mittelwerte aus 350 h über 42 Werte (3 d^{-1}) und Standardabweichungen der biologischen Trockenmasse (BTM) von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit unterschiedlichen Nitratangeboten.

Kultur	NO₃²⁻ [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	PO₄³⁻ [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	BTM [g L^{-1}]
N ₇₅	75	90	0.16 ± 0.01
N ₁₅₀	150	90	0.16 ± 0.01
N ₃₀₀	300	90	0.16 ± 0.01
N ₆₀₀	600	90	0.17 ± 0.01
REF	1800	90	0.22 ± 0.02
Mittelwert			0.17 ± 0.03
Abweichung [%]			15.6

3.3.3. Wachstumsrate μ

Nachdem die Kulturen den OD-Sollwert von 1 erreichten (Kap. 3.3.), wurde der turbidostatische Prozess gestartet.

Die aus dem Pumpvolumen ermittelten zeitlichen Verläufe der Wachstumsraten (Gleichung 2.2., Kap. 2.3.4) der Kulturexperimente bei $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sind in Abb. 3.3.5. über einen Zeitraum von 350 h dargestellt.

Die Wachstumsrate der Referenzkultur stieg nach Prozessbeginn kontinuierlich an und erreichte nach 150 h den maximalen Wert von $\mu = 0.55$. Dieser Wert entsprach auch dem Endwert nach 350 h.

In den nitratlimitierten Kulturen nahmen die Wachstumsraten in den ersten 75 h (N₇₅), 100 h (N₁₅₀), 125 h (N₃₀₀) und 175 h (N₆₀₀) ebenfalls zu. Mit einer Ausnahme (N₆₀₀), deren zeitlicher Verlauf bis zum Prozessende konstant blieb, sanken die Wachstumsraten der restlichen Kulturen anschließend wieder. Nach 350 h wiesen die Wachstumsraten der Kulturen N₇₅, N₁₅₀, N₃₀₀ und N₆₀₀ mit 0.05, 0.07, 0.2 und 0.28 deutliche Unterschiede in ihren Werten auf.

Der Rückgang der Wachstumsrate der Kulturen, die mit nitratlimitierten Medium kultiviert wurden, belief sich im Vergleich zur Wachstumsrate der Referenzkultur damit auf 47 % (N₆₀₀) bis 91 % (N₇₅).

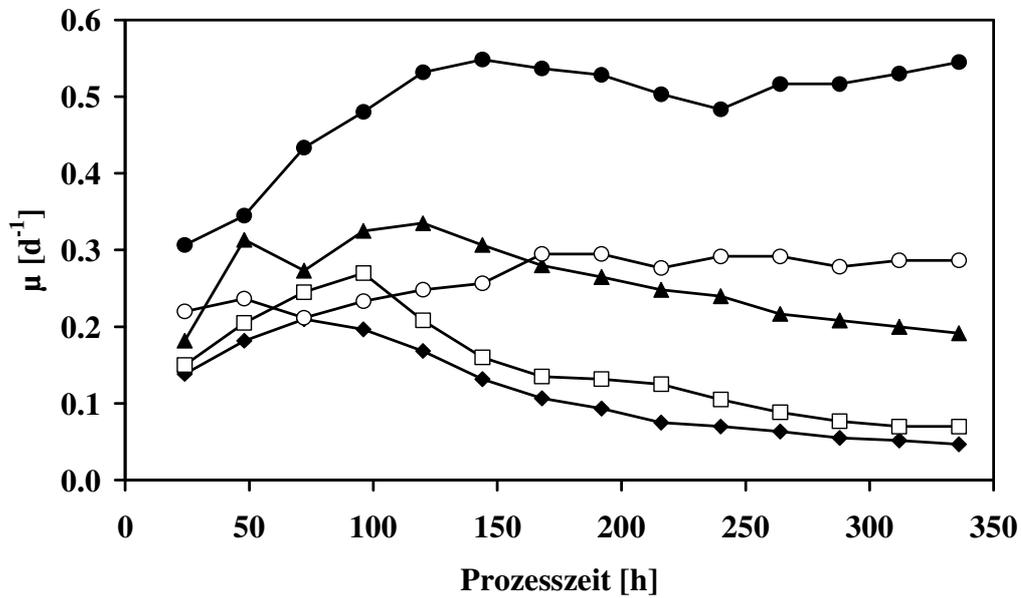


Abb. 3.3.5. Zeitlicher Verlauf der Wachstumsraten [d^{-1}] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} L^{-1}$) in den Medienreservoirren: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●) REF 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} L^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} L^{-1}$

3.3.4. Pigmente

Die Pigmentanalyse wurde wie in *Kap. 2.3.6.* beschrieben, durchgeführt. Daraus resultierende Konzentrationen wurden auf BTM bezogen und werden in mg g^{-1} angegeben.

Aus den *Kap. 3.1.* und *3.2.* der Experimente bei $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ging bereits hervor, dass die Mikroalge *N. salina* auf neue Wachstumsparameter durch Adaptionphasen reagiert.

Die Effekte unterschiedlicher Nährstoffverfügbarkeiten und Temperaturen werden erst nach Ablauf dieser Phase sichtbar und so wurde die vor dieser Prozesszeit liegende Anpassungsphase bei diesen Kulturexperimenten (*Kap. 3.3.4.*) analytisch nicht mehr berücksichtigt.

Die zeitlichen Verläufe der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx), und β -Karotin wurden in *Abb. 3.3.6. A - C* ab $t = 150\text{ h}$ nach Prozessbeginn dargestellt.

Der Einfluss unterschiedlicher Nitratkonzentrationen auf die Pigmente wurde durch die deutlichen Konzentrationsunterschiede zwischen den Kulturen offensichtlich. Die höchsten Pigmentkonzentrationen, in den Bereichen von $14\text{ bis }17\text{ mg Chl}_a [\text{g BTM}]^{-1}$, $1.4\text{ mg Vx} [\text{g BTM}]^{-1}$ und $0.3\text{ mg } \beta\text{-Karotin} [\text{g BTM}]^{-1}$ liegend, wiesen die Referenzkultur und die Kultur N_{600} (*Abb. 3.3.6.*) am Prozessende nach 350 h auf (*Tab. 3.3.3.*). Erheblich niedriger fielen die Konzentrationen der nitratlimitierten Kulturen N_{75} und N_{150} aus. Diese reagierten auf die Nährstofflimitierung mit einer Abnahme der Pigmentkonzentrationen um $90 (\pm 3)\%$ bei Chl_a und Vx (*Abb. 3.3.6. A, B*). Die β -Karatinkonzentration (*Abb. 3.3.6. C*) fiel in den letzten beiden Prozesstagen sogar unter die Nachweisgrenze. Die Pigmentkonzentrationen der Kultur N_{300} fügten sich einmal mit $6.7\text{ mg Chl}_a [\text{g BTM}]^{-1}$ in einen Wertebereich, der deutlich zwischen den Kulturen REF/ N_{600} und N_{75}/ N_{150} lag (*Abb. 3.3.6. A*). Ein weiteres Mal verliefen sie mit $0.3\text{ mg Vx} [\text{g BTM}]^{-1}$ im Wertebereich von N_{75}/ N_{150} (*Abb. 3.3.6. B*) bzw. mit $0.2\text{ mg } \beta\text{-Karotin} [\text{g BTM}]^{-1}$ im Wertebereich von REF/ N_{600} (*Abb. 3.3.6. C*).

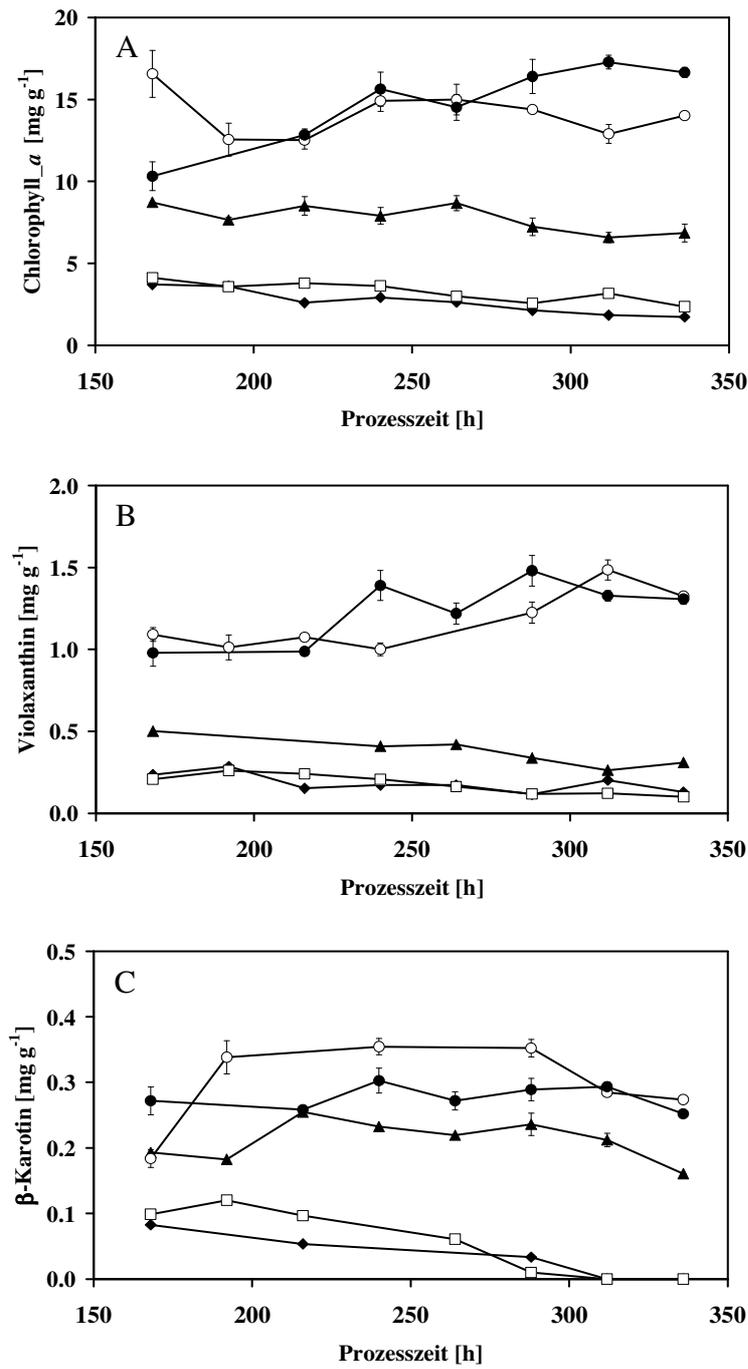


Abb. 3.3.6. Zeitlicher Verlauf der auf die BTM bezogene Chlorophyll_a- (A), Violaxanthin- (B) und β -Karatinkonzentration (C) in [mg g⁻¹] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirern: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●) REF 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Tab. 3.3.3. Stationäre Werte der Pigmente Chlorophyll_a (Chl_a), Violaxanthin (Vx) und β -Karotin (β -Kar) der Experimente bei 26 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten nach 350 h. Angegeben sind die Mittelwerte der letzten drei Prozesstage (n=6) mit ihren Standardabweichungen. Alle Pigmente wurden auf die BTM [mg g]⁻¹ bezogen. n.n. = nicht nachweisbar

Kultur	NO ₃ ²⁻ [μ mol L ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [μ mol L ⁻¹]	Chl _a [mg g ⁻¹]	Vx [mg g ⁻¹]	β -Kar [mg g ⁻¹]
N ₇₅	75	90	1.78 ± 0.07	0.15 ± 0.05	n.n.
N ₁₅₀	150	90	2.76 ± 0.58	0.11 ± 0.01	n.n.
N ₃₀₀	300	90	6.71 ± 0.19	0.30 ± 0.04	0.19 ± 0.04
N ₆₀₀	600	90	13.46 ± 0.79	1.34 ± 0.11	0.28 ± 0.01
REF	1800	90	16.78 ± 0.45	1.37 ± 0.11	0.28 ± 0.00

3.3.5. Fettsäuren (Fatty Acids, FA)

Wie bereits in Kap. 3.3.4. erwähnt, wurden die ersten 150 h des turbidostatischen Prozesses, in denen sich die Kulturen in der Adaptionsphase befanden, bezüglich der analytischen Fettsäureergebnisse nicht weiter berücksichtigt.

3.3.5.1. Gesamtfettsäurekonzentration (Total Fatty Acid, TFA)

Die zeitlichen Verläufe der TFA-Konzentrationen der Nitratexperimente bei 26 °C werden in Abb. 3.3.7. präsentiert. Diese sind auf die BTM bezogen und in TFA [% w/w BTM] angegeben.

In keinem Konzentrationsverlauf der fünf untersuchten Kulturen, nitratlimitiert oder nicht, gab es in dem Prozesszeitraum von 150 bis 350 h eine zeitliche Entwicklung. Die TFA-Werte konnten in drei Wertebereiche eingeteilt werden. Nitratlimitierte Kulturen wie N₇₅, N₁₅₀ und N₃₀₀ (Abb. 3.3.7.) bildeten eine Gruppe, die mit 42 bis 47 % TFA am höchsten lag. Nach unten abweichend befanden sich die TFA-Konzentrationen der Kultur N₆₀₀ mit 30 % TFA (Abb. 3.3.7.). Die mit Abstand niedrigsten TFA-Konzentrationen wurden in der Referenzkultur (Abb. 3.3.7.) mit 12 % TFA gemessen (Tab. 3.3.4.).

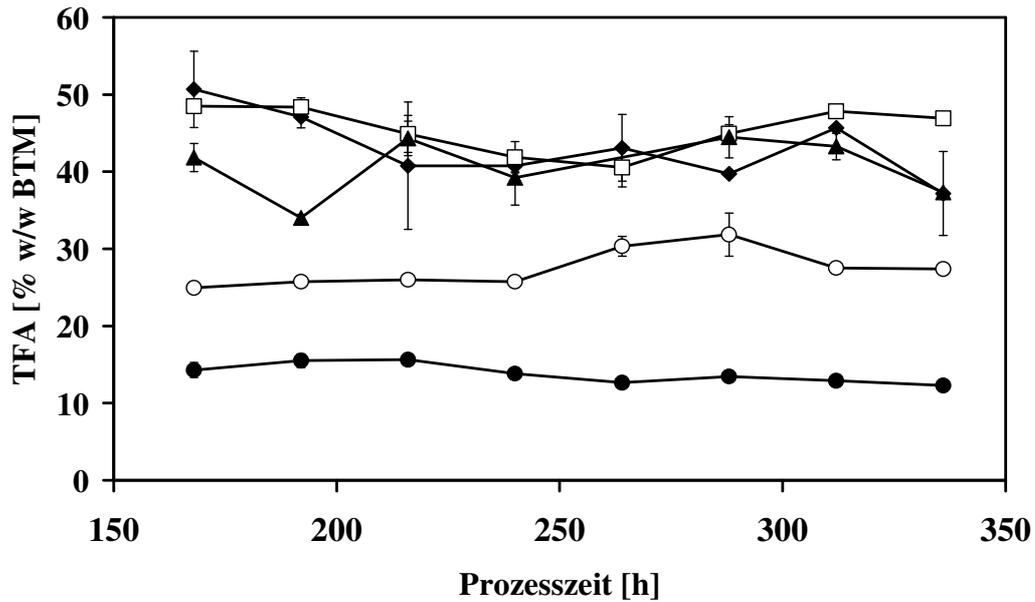


Abb. 3.3.7. Zeitlicher Verlauf der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●) REF 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Tab. 3.3.4. Werte der Gesamtfettsäurekonzentration (TFA) und Eicosapentaensäurekonzentration (EPA) nach 350 h der Experimente bei 26 °C und unterschiedlichen Nitratangeboten. Die TFA-Werte sind nur auf die BTM [% BTM] und die EPA-Werte sind auf BTM [% BTM], auf TFA [% TFA] und auf PUFA (poly unsaturated fatty acid) [% PUFA] bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 4$) der letzten beiden Prozesstage mit ihren Standardabweichungen. $\mu^* = \mu\text{mol L}^{-1}$

Kultur	NO_3^{2-}	PO_4^{3-}	TFA	EPA	EPA	EPA
	[μ^*]	[μ^*]	[% BTM]	[% BTM]	[% TFA]	[% PUFA]
N ₇₅	75	90	42.98 ± 5.33	1.17 ± 0.10	2.71 ± 0.10	45.01 ± 1.67
N ₁₅₀	150	90	46.28 ± 1.02	1.50 ± 0.09	3.23 ± 0.26	46.22 ± 1.86
N ₃₀₀	300	90	40.21 ± 2.28	1.98 ± 0.10	4.91 ± 0.04	53.05 ± 1.23
N ₆₀₀	600	90	28.18 ± 0.06	2.72 ± 0.05	9.66 ± 0.16	66.59 ± 1.96
REF	1800	90	12.77 ± 0.23	2.18 ± 0.21	17.06 ± 1.30	69.20 ± 0.32

Die Nitratlimitierung bei 26 °C führte in den Kulturen N₇₅, N₁₅₀ und N₃₀₀ (44 (±3) % TFA) zu einer Steigerung der TFA-Konzentration um das 3.7-fache gegenüber der TFA-Konzentration der Referenzkultur am Ende der Prozesszeit.

3.3.5.2. Eicosapentaensäure (EPA, C20:5ω3)

3.3.5.2.1. Einfluss von Nitrat auf die BTM bezogene EPA-Konzentration

Die zeitlichen Verläufe der EPA-Konzentration der Nitratexperimente bei 26 °C, bezogen auf die BTM (EPA [% w/w BTM]), sind in *Abb. 3.3.8.* dargestellt.

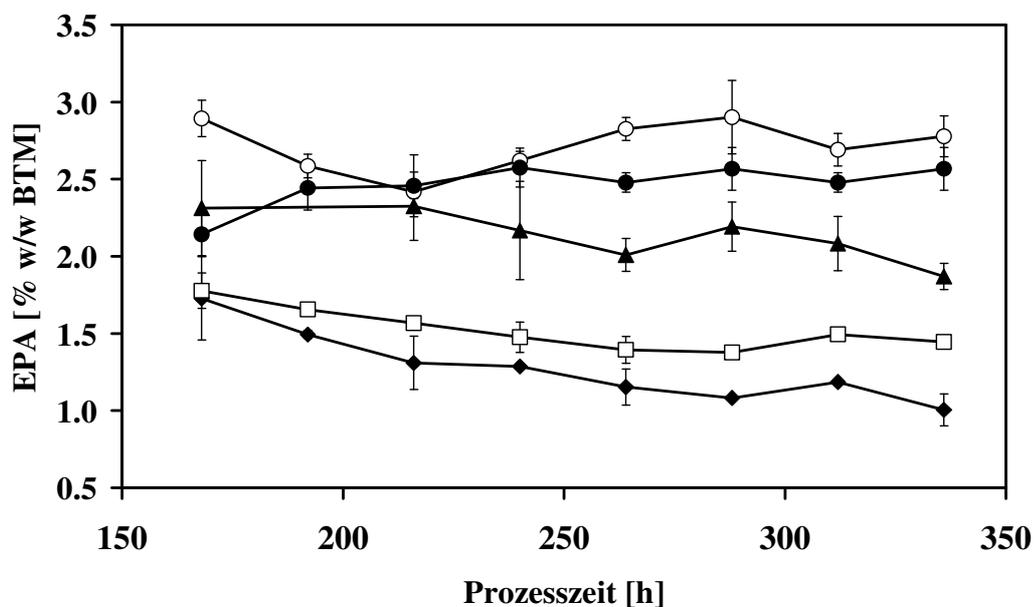


Abb. 3.3.8. Zeitlicher Verlauf der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w BTM] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoirien: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●) REF 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Diese zeigten keine zeitliche Entwicklung innerhalb des Prozesszeitraums von 150 bis 350 h. Der Anteil von EPA pro BTM verhielt sich, wie bereits in den *Kap. 3.1.6.* und *3.2.6.* dargelegt, entgegengesetzt zu TFA [% BTM]. Die EPA-Werte waren über einen Bereich von

1 bis 3 % EPA verteilt. Die höchsten Konzentrationen an EPA [% BTM], ohne signifikante Unterschiede, wiesen die Referenzkultur und die Kultur N₆₀₀ auf. Mit ihren Endwerten von 2.7 (±0.1) % EPA waren sie um das 2.5-fache, im Vergleich zu der am stärksten nitratlimitierten Kultur N₇₅ erhöht (Tab. 3.3.4.).

Mit diesem Ergebnis wird wiederholt bestätigt (Kap. 3.1.6., 3.2.6.), dass eine zunehmende Nitratversorgung im Medium zu einem Anstieg der EPA-Produktion in der Mikroalge *N. salina* führt.

3.3.5.2.2. Einfluss von Nitrat auf die TFA bezogene EPA-Konzentration

Der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils von EPA an TFA (EPA [% w/w TFA]) ist in Abb. 3.3.9. aufgeführt.

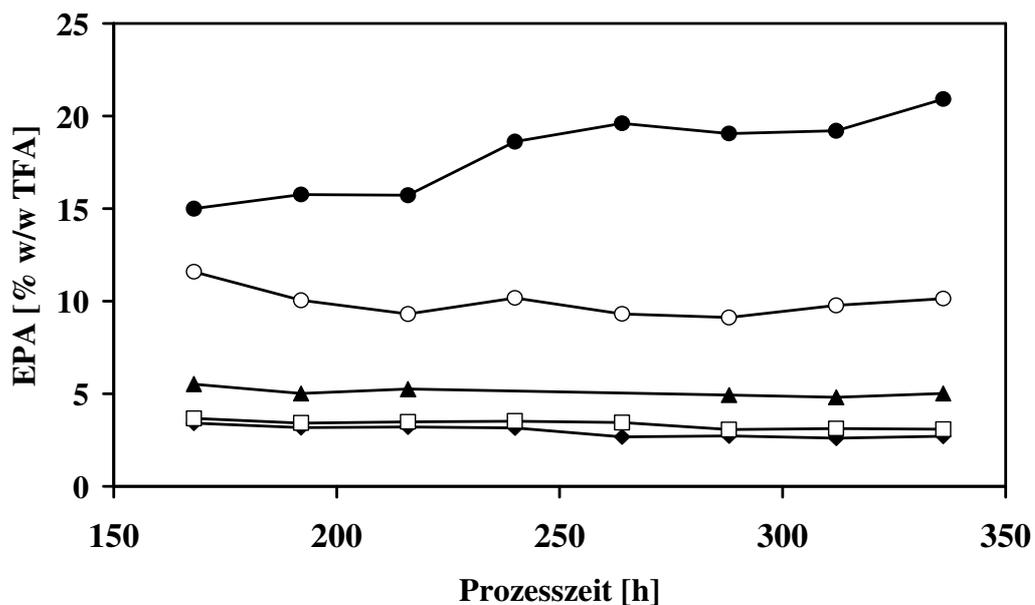


Abb. 3.3.9. Zeitlicher Verlauf der der Eicosapentaensäure (EPA) [% w/w TFA] von *N. salina* Kulturen unter turbidostatischen Prozessbedingungen bei 26 °C. Variierende Nitratkonzentrationen ($\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$) in den Medienreservoir: (◆) 75; (□) 150; (▲) 300; (○) 600; (●) REF 1800 $\mu\text{mol NO}_3^{2-} \text{L}^{-1}$ und 90 $\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$

Keine der nitratlimitierten Kulturen zeigte eine zeitliche Entwicklung bezüglich des Anteils von EPA an TFA in ihren Ergebnissen. Lediglich die Referenzkultur, deren EPA-Anteile bezogen auf die TFA-Werte von 15 auf 20 % über den betrachteten Prozesszeitraum

anstiegen, bildete eine Ausnahme. Insgesamt betrachtet, stellten sich die EPA-Werte der fünf *N. salina*-Kulturen in drei Konzentrationsabschnitten dar (Tab. 3.3.4.). Die geringsten Anteile von EPA an TFA mit 3 bis 5 % hatten die nitratlimitierten Kulturen N₇₅, N₁₅₀ und N₃₀₀ (Abb. 3.3.9.). Darüber lagen die Kultur N₆₀₀ mit einem Anteil von 10 % EPA und die Referenzkultur mit einem Anteil von 20 % EPA (Abb. 3.3.9.).

3.4. Ergebnisse der Kultivierung von *Nannochloropsis salina* bei 29 °C im Vollmedium

Um ein ausführlicheres Bild von der Temperaturabhängigkeit der Mikroalge *N. salina* zu erhalten, wurden neben physiologischen Untersuchungen bei 17°C, 21 °C und 26 °C ergänzende Experimente bei 29 °C durchgeführt. Hierzu wurde nur eine Kultur untersucht, die den Nährstoffbedingungen der Referenzkulturen aus den vorangegangenen Kap.3.1. bis 3.3. entsprach.

Die in den Anpassungsphasen deutlich werdende Reaktion auf die Umstellung der Mikroalge *N. salina* auf neue Umweltparameter sind bereits in den Kap. 3.1. und 3.2. präsentiert worden. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel auf die Darstellung zeitlicher Verläufe verzichtet und lediglich die Daten präsentiert, die zum Prozessende (nach 350 h) ermittelt wurden (Tab. 3.4.1.).

Die Endzustände dieses Versuches bei 29 °C sowie die Endzustände nach 350 h der bereits beschriebenen Experimente (Kap. 3.1. – 3.3.) werden im folgenden Kapitel (Kap. 3.5.) in Relation zu den jeweiligen Kultivierungsbedingungen gesetzt.

Tab. 3.4.1. Zusammenfassung von Werten unterschiedlicher physiologischer Parameter von *N. salina*, kultiviert im Vollmedium bei 29 °C. Angegeben sind die Mittelwerte der letzten zwei Prozesstage mit ihren Standardabweichungen. *n* = Anzahl der Werte

Parameter	n	Einheiten	Werte
BTM	6	[mg L ⁻¹]	0.24 ± 0.01
μ		[d ⁻¹]	0.347
Fluoreszenz offline			
F	2	[r.E.]	237 ± 4
F _M '	2	[r.E.]	613 ± 7
Φ _{PSII}	2	[r.E.]	0.614 ± 0.001
Pigmente			
Chlorophyll _a	4	mg [g BTM] ⁻¹	9.60 ± 0.35
Violaxanthin	4	mg [g BTM] ⁻¹	0.97 ± 0.04
β-Karotin	4	mg [g BTM] ⁻¹	0.16 ± 0.01
Vaucherixanthin	4	Area [g BTM] ⁻¹	2545 ± 88
Fettsäuren			
TFA	6	[% BTM]	12.87 ± 0.12
EPA	6	[% BTM]	1.85 ± 0.07
EPA	6	[% TFA]	14.35 ± 0.64
EPA	6	[% PUFA]	66.74 ± 0.20
S+M	6	[% BTM]	9.35 ± 0.13
S+M	6	[% TFA]	72.63 ± 0.30
PUFA	6	[% BTM]	2.77 ± 0.11
PUFA	6	[% TFA]	21.5 ± 1.03

3.5. Vergleich der experimentellen Endzustände in Relation zu den Kultivierungsbedingungen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den Gleichgewichtszuständen der einzelnen Kulturexperimente (Kap. 3.1.- 3.4.) in Relation zu den Kultivierungsbedingungen betrachtet.

3.5.1. Biologische Trockenmasse (BTM) und Wachstumsrate (μ)

Bei allen Experimenten wurden, mittels eines turbidostatischen Prozesses, unabhängig von der jeweiligen Prozessführung (Temperatur, Nährstoffangebot) nahezu gleiche BTM-Werte erzielt. Der Mittelwert der BTM über alle ermittelten BTM-Werte der Experimente betrug $0.18 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$, das entricht einer Abweichung von 13 %.

Die in dieser Arbeit festgestellte maximale Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu = 0.53 \text{ d}^{-1}$) hatte die Mikroalge *N. salina* im Vollmedium bei 26 °C (Abb. 3.5.1.).

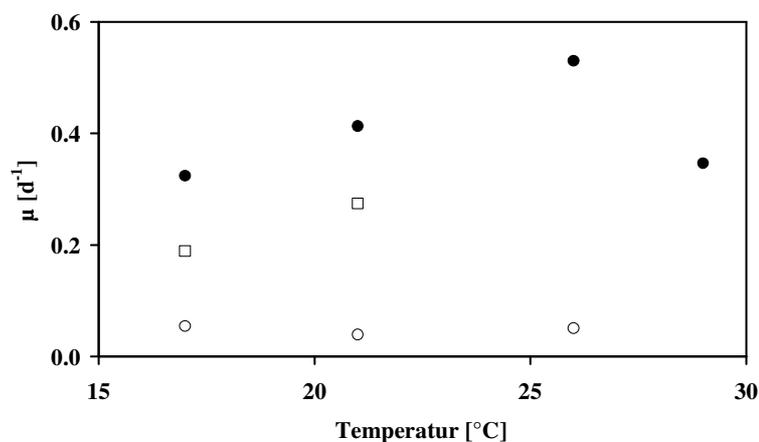


Abb. 3.5.1. Einfluss der Temperatur auf die Wachstumsraten μ [d⁻¹] von Kulturen (●) ohne Nitratlimitierung REF, (○) mit Nitratlimitierung N₇₅ und (□) mit Phosphatlimitierung unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

Oberhalb (29 °C) und unterhalb (21 °C, 17 °C) dieser Temperatur fiel die Wachstumsrate deutlich ab. Einen größeren Einfluss als die Temperatur dagegen hatte die Nitratlimitierung auf die Wachstumsraten von *N. salina*, dies ist ebenfalls in Abb. 3.5.1. zu erkennen. Die

Wachstumsrate der Kultur N₇₅ bei 26 °C ($\mu = 0.05 \text{ d}^{-1}$) ist geringer als die kleinste Wachstumsrate der Referenzkultur ($\mu = 0.32 \text{ d}^{-1}$; 17 °C).

Die Auswirkung einer Temperaturänderung auf μ wurde lediglich bei phosphatlimitierten Kulturen P₆ bei 21 °C ($\mu = 0.27 \text{ d}^{-1}$) und 17 °C ($\mu = 0.19 \text{ d}^{-1}$) untersucht (Abb. 3.5.1.). Diese Werte lagen unterhalb der Referenzkulturen und wiesen, wie auch die Referenzkulturen, einen steigenden Verlauf von μ bei einem Temperaturanstieg von 17 °C auf 21 °C auf.

Stellt man die Wachstumsraten von nitrat- und phosphatlimitierten Kulturen gegenüber, so ist festzustellen, dass Nitratmangel zu einer stärkeren Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit von *N. salina* führte als Phosphatmangel. Dieses war auch anhand unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatverfügbarkeiten ersichtlich (Abb. 3.5.2. A, B).

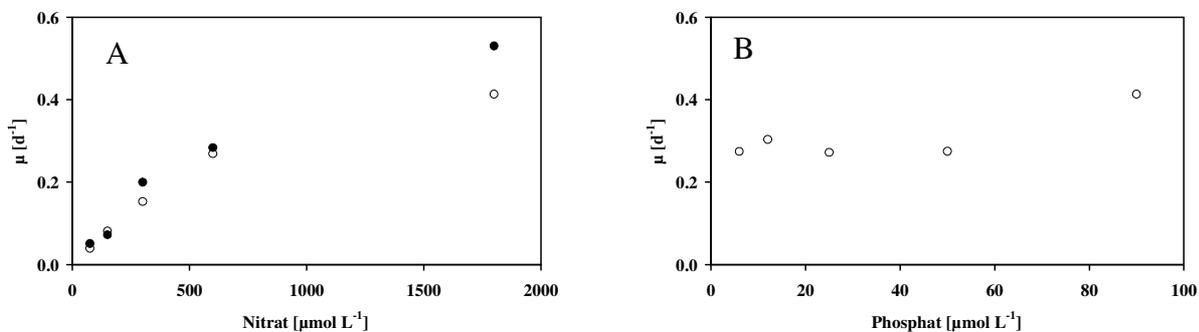


Abb. 3.5.2. Einfluss der (A) Nitratkonzentration bei (○) 21 °C und (●) 26 °C und Einfluss der (B) Phosphatkonzentration bei (○) 21 °C auf die Wachstumsraten μ [d^{-1}] der *N. salina*-Experimente unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

In Abb. 3.5.2. dargestellt, waren die Wachstumsraten der Kulturen in einem Bereich von 6 bis 50 $\mu\text{mol P L}^{-1}$ mit $\mu = 0.28 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ niedriger als die der Referenz (90 $\mu\text{mol P L}^{-1}$) mit $\mu = 0.41 \text{ d}^{-1}$. Aber es gab zum einen keine Abstufung von μ innerhalb dieses Bereiches und zum anderen lagen diese Wachstumsraten in dem gleichen Wertebereich wie die der Kulturen N₆₀₀ (Abb. 3.5.2. A). Indessen gab es einen steten Anstieg der Wachstumsrate bei steigender Nitratkonzentration (Abb. 3.5.2. A). Dabei gab es nur marginale Unterschiede in dem Bereich von 75 bis 600 $\mu\text{M N L}^{-1}$ zwischen 21 °C und 26 °C. Erst bei den Referenzkulturen bewirkte eine Temperaturänderung unterschiedliche Wachstumsraten (siehe auch Abb. 3.5.1.).

3.5.2. Intrazelluläre Nitrat- und Phosphatkonzentrationen

Die Ergebnisse der intrazellulären Stickstoff- und Phosphatkonzentration geben Hinweise auf einen Einfluss der Temperatur auf die Nährstoffaufnahme.

Bei geringeren Temperaturen zeichnete sich eine abnehmende Tendenz in der Nitrataufnahme ab (Abb. 3.5.3. A).

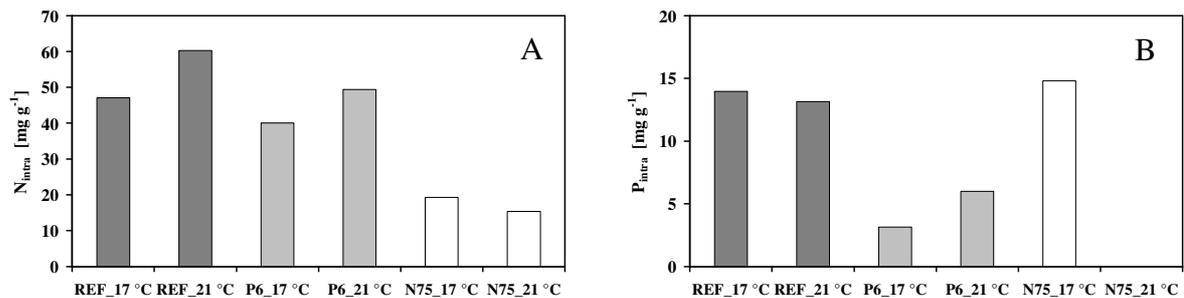


Abb. 3.5.3. Auf die BTM bezogene intrazelluläre (A) Stickstoffkonzentration und (B) Phosphatkonzentration in *N. salina*-Kulturen bei 17 °C und 21 °C. REF Referenzkultur; P₆ phosphatlimitiert; N₇₅ nitratlimitiert

Die Referenzkultur, d.h. volle Nitratversorgung ($1800 \mu\text{mol L}^{-1}$), nahm 22 % weniger Stickstoff bei 17 °C (47.1 mg g^{-1}) im Vergleich zu 21 °C (60.3 mg g^{-1}) auf. Ergebnisse der Kultur P₆, d.h. volle Nitrat- bei gleichzeitig limitierter Phosphatversorgung, ergaben eine Abnahme des intrazellulären Stickstoffs um 19 % bei einer Temperaturabsenkung von 21 °C (49.4 mg g^{-1}) auf 17 °C (40.1 mg g^{-1}). Zugleich scheint neben der Temperatur ein limitiertes Phosphatangebot eine nachteilige Wirkung auf die Nitrataufnahme zu haben (Abb. 3.5.3. A). So sank im Vergleich zur Referenz der intrazelluläre Stickstoffgehalt der Kulturen P₆ bei 17 °C und 21 °C um 15 % und 18 %. In den nitratlimitierten Kulturen geht die intrazelluläre Stickstoffkonzentration aufgrund des geringen Nitratangebotes im Vergleich zur Referenz um 74 % bei 21 °C (15.4 mg g^{-1}) und um 59 % bei 17 °C (19.3 mg g^{-1}) zurück (Abb. 3.5.3. A).

Die Phosphataufnahme (Abb. 3.5.3. B) bei voller Phosphatversorgung (REF) scheint, bei einer Abweichung um 6 % durch eine Temperaturänderung von 4 °C, nahezu unbeeinflusst zu bleiben. Dagegen nimmt die Phosphatkonzentration bei phosphatlimitierten Kulturen (P₆) in der Mikroalge bei einer Absenkung der Temperatur von 21 °C (6.0 mg g^{-1}) auf 17 °C (3.1 mg g^{-1}) um 48 % ab. Der Einfluss einer Nitratlimitation auf die Phosphataufnahme (Abb. 3.5.3. B) scheint, im Gegensatz zum Einfluss einer Phosphatlimitation auf die Stickstoffaufnahme

(Abb. 3.5.3. A), bei einer Abweichung von 6 % bei 17 °C nicht gegeben zu sein. Die intrazelluläre Phosphatkonzentration der Kulturen N₇₅ bei 21 °C wurde nicht untersucht.

In den phosphatlimitierten Kulturen geht die intrazelluläre Phosphatkonzentration aufgrund des geringen Phosphatangebotes im Vergleich zur Referenz um 54 % bei 21 °C (6.0 mg g⁻¹) und um 78 % bei 17 °C (3.1 mg g⁻¹) zurück (Abb. 3.5.3. B).

3.5.3. Fettsäuren

In Abb. 3.5.4. A sind die auf die BTM bezogene Konzentrationen der Gesamtfettsäuren TFA (TFA [% BTM]) und der ω₃-Fettsäure Eicosapentaensäure EPA (EPA [% BTM]) der Referenzkulturen dargestellt.

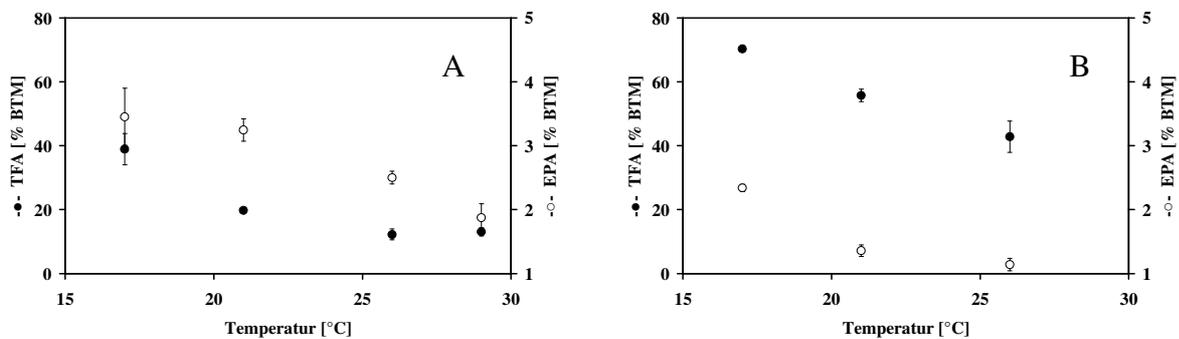


Abb. 3.5.4. Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der Gesamtfettsäure TFA [% BTM] und Eicosapentaensäure EPA [% BTM] von Kulturen (A) ohne Nitratlimitierung REF und (B) mit Nitratlimitierung N₇₅ unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

TFA und EPA nahmen mit steigender Temperatur ab, doch gab es mit jeweils 13 % keine Unterschiede in der TFA-Konzentration bei 26 °C und 29 °C und keine signifikanten Unterschiede in der EPA-Konzentration bei 17 °C (3.5 %) und 21 °C (3.1 %). Abnehmende TFA- und EPA-Konzentrationen waren auch in nitratlimitierten Kulturen bei höheren Temperaturen zu beobachten (Abb. 3.5.4. B). Jedoch geht aus den Abb. 3.5.4. A und B deutlich hervor, dass die Nitratlimitierung und nicht die Temperatur der entscheidende Parameter für eine gesteigerte TFA-Produktion war. Denn unabhängig von der Temperatur produzierten nitratlimitierte Kulturen mit 43 bis 70 % [BTM⁻¹] mehr TFA (Abb. 3.5.4. B) als die Referenzkultur bei 17 °C (39 % [BTM⁻¹]) (Abb. 3.5.4. B).

Die höchste TFA-Konzentration mit 70 % [BTM⁻¹] und höchste EPA-Konzentration mit 3.5 % [BTM⁻¹] wurden bei 17 °C erzielt. Dabei begünstigte eine volle Nitratversorgung die EPA- und eine strenge Nitratlimitierung die TFA-Konzentration.

Ungeachtet des Nitratangebotes sinkt EPA [% BTM] bei steigenden Temperaturen (Abb. 3.5.4.). Dieser Effekt traf nicht auf die TFA bezogene EPA-Konzentration EPA [% TFA] zu. Das Gegenteil war der Fall. Mit höheren Temperaturen nahm EPA [% TFA] in den Referenzkulturen zu und blieb gleich in den nitratlimitierten Kulturen (Abb. 3.5.5.).

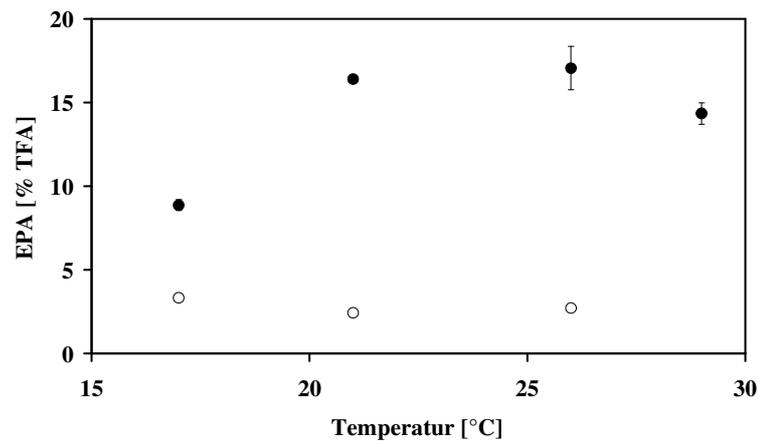


Abb. 3.5.5. Einfluss der Temperatur auf die Konzentration von Eicosapentaensäure EPA [% TFA] von Kulturen (●) ohne Nitratlimitierung REF und mit (○) Nitratlimitierung N₇₅ unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h

In Abb. 3.5.6. sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA [% BTM]) der Referenzkulturen und der nitratlimitierten Kulturen dargestellt.

Höhere Temperaturen und ein stark eingeschränktes Nitratangebot waren Faktoren, welche zu einer Abnahme des PUFA-Gehaltes führten. In Abb. 3.5.6. ist zu sehen, dass die PUFA-Konzentration der Referenzkultur bei 21 °C mit 4 % genauso hoch war wie die der Kultur N₇₅ bei 17 °C (siehe auch Tab. 3.5.1.). Das könnte darauf hinweisen, dass der Parameter Temperatur die PUFA-Konzentration stärker beeinflusst als eine volle Nitratversorgung.

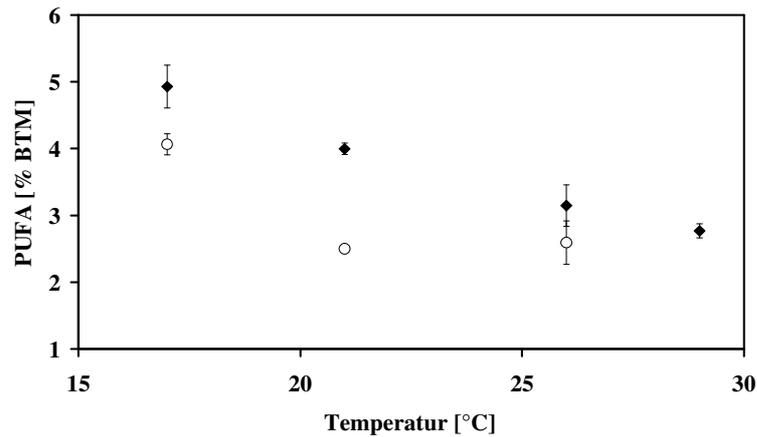


Abb. 3.5.6. Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren PUFA [% BTM] von Kulturen (●) ohne Nitratlimitierung REF und (○) mit Nitratlimitierung N₇₅ unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h

Bei phosphatlimitierten Kulturen gab es keinen Hinweis, dass Phosphatmangel bei 21 °C eine Auswirkung auf PUFA [% BTM] hatte (Abb. 3.5.7.). Dafür sprachen die äquivalenten Konzentrationen an PUFA in der Referenzkultur und der Kultur P₆ mit 4 %. Bei einer Absenkung der Temperatur von 21 °C auf 17 °C nahm jedoch der PUFA-Gehalt in P₆ ab (↓), was im Gegensatz zur Reaktion der Mikroalge bei Nitratmangel (↑) bzw. zur Referenzkultur (↑) stand.

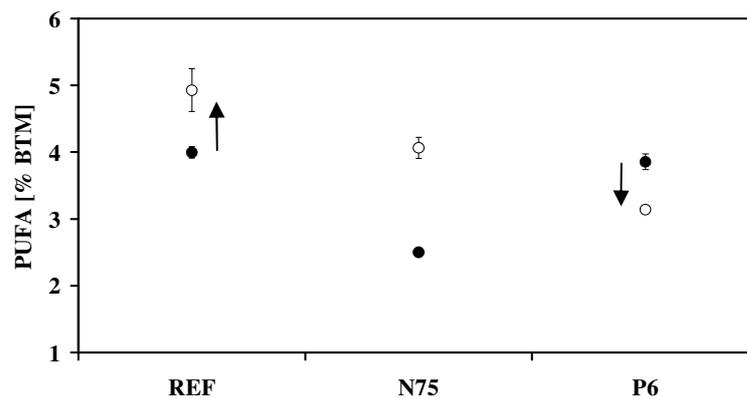


Abb. 3.5.7. Einfluss von Nitratlimitierung (N₇₅) und Phosphatlimitierung (P₆) auf die Konzentration der PUFA [% BTM] von *N. salina* Kulturen bei (●) 21 °C und (○) 17 °C unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit. REF Referenz; (↓) abnehmend; (↑) zunehmend

Tab. 3.5.1. Werte der gesättigten Fettsäuren (S), einfach ungesättigten Fettsäuren (M) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) nach 350 h der Experimente bei 21 °C, 17 °C, 26 °C und unterschiedlichen Nitrat- und Phosphatangeboten. Die S+M sowie die PUFA-Werte sind auf die BTM [% BTM] und auf TFA [% TFA] bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=4) der letzten beiden Prozesstage mit ihren Standardabweichungen. $\mu^* = \mu\text{mol L}^{-1}$

Kultur (21 °C)	NO₃²⁻ [μ^*]	PO₄³⁻ [μ^*]	S+M [% BTM]	S+M [% TFA]	PUFA [% BTM]	PUFA [% TFA]
N ₇₅	75	90	50.13 ± 0.00	94.53 ± 0.07	2.50 ± 0.01	4.17 ± 0.02
N ₁₅₀	150	90	44.52 ± 1.83	93.37 ± 0.62	3.14 ± 0.04	6.57 ± 0.31
N ₃₀₀	300	90	40.90 ± 3.47	90.43 ± 0.33	4.22 ± 0.12	9.33 ± 0.50
N ₆₀₀	600	90	26.44 ± 0.70	86.48 ± 0.65	4.20 ± 0.03	13.72 ± 0.56
P ₆	1800	6	19.82 ± 1.84	83.41 ± 1.41	3.85 ± 0.12	16.22 ± 2.27
P ₁₂	1800	12	19.74 ± 1.09	83.40 ± 0.57	3.93 ± 0.24	16.60 ± 0.03
P ₂₅	1800	25	18.83 ± 0.44	81.20 ± 1.64	4.35 ± 0.08	18.74 ± 0.46
P ₅₀	1800	50	19.34 ± 0.78	82.74 ± 0.09	4.04 ± 0.14	17.26 ± 0.09
REF	1800	90	14.87 ± 0.44	78.02 ± 0.53	4.00 ± 0.09	20.96 ± 0.31
Kultur						
(17 °C)						
N ₇₅	1800	90	64.23 ± 2.46	91.29 ± 3.19	4.06 ± 0.16	5.78 ± 0.20
P ₆	75	90	33.99 ± 0.42	90.71 ± 0.60	3.14 ± 0.03	8.38 ± 0.02
REF	1800	6	34.19 ± 3.05	86.87 ± 0.37	4.93 ± 0.32	12.52 ± 0.25
Kultur						
(26 °C)						
N ₇₅	75	90	39.95 ± 1.83	92.94 ± 7.28	2.59 ± 0.32	6.03 ± 0.01
N ₁₅₀	150	90	42.81 ± 1.11	92.50 ± 0.36	3.24 ± 0.06	6.99 ± 0.29
N ₃₀₀	300	90	36.10 ± 2.27	89.79 ± 0.56	3.72 ± 0.09	9.26 ± 0.29
N ₆₀₀	600	90	23.09 ± 0.25	81.92 ± 0.72	4.09 ± 0.04	14.50 ± 0.18
REF	1800	90	9.37 ± 0.42	73.42 ± 1.96	3.15 ± 0.31	24.65 ± 1.99

Der Anteil von EPA an PUFA (EPA [% PUFA]) im Vergleich zur Summe anderer mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Σ C18:2 ω 6, C18:3 ω 6, C20:3 ω 6, C20:4 ω 6; PUFA* [% PUFA]) lag

in den Referenzkulturen (Abb. 3.5.8. A) mit 70 – 80 % deutlich höher als EPA [% PUFA] der nitratlimitierten Kulturen (Abb. 3.5.8. B) mit 50 – 60 %.

Ungeachtet dessen, dass Nitratmangel EPA [% BTM] (Abb. 3.5.4.) und damit auch PUFA [% BTM] (Abb. 3.5.6.) senkte, führte er auch zu einer Abnahme von EPA [% PUFA]. Das ist nicht zwangsläufig der Fall, denn gleiche Werte von z.B. 4 % PUFA [BTM⁻¹] (Abb. 3.5.6.) bei N₇₅_17 °C und REF_21 °C führten einmal zu 60 % und einmal zu 70 % EPA [PUFA⁻¹] (Abb. 3.5.8.). Es scheint demnach bei Nitratmangel eine zusätzliche Beeinträchtigung der Synthese von EPA aus den Vorläufern (C18:2ω6, C18:3ω6, C20:3ω6, C20:4ω6) zu geben.

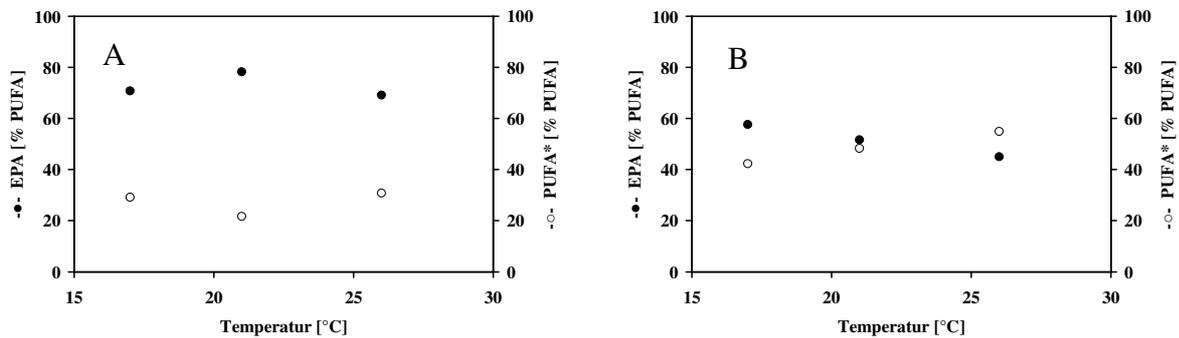


Abb. 3.5.8. Einfluss der Temperatur auf den Anteil von EPA an PUFA und die Summe des Anteils anderer ungesättigter Fettsäuren excl. EPA (PUFA*) an PUFA (A) in der Referenzkultur und (B) in einer nitratlimitierten Kultur.

In Abb. 3.5.9. wurde der Einfluss unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatkonzentrationen auf die Gesamtfettsäuren TFA [% BTM] und die Eicosapentaensäure EPA [% BTM] in *N. salina*-Experimenten bei 21 °C dargestellt.

Zwischen Nitratverfügbarkeit und EPA [% BTM] bestand eine direkte und zwischen Nitratverfügbarkeit und TFA [% BTM] eine umgekehrte Proportionalität (Abb. 3.5.9. A).

Unterschiedliche Phosphatangebote dagegen (Abb. 3.5.9. B) beeinflussten weder die TFA- noch die EPA-Produktion. TFA- und EPA-Werte von phosphatlimitierten Kulturen und Referenzkultur wiesen im Vergleich keine signifikanten Änderungen auf.

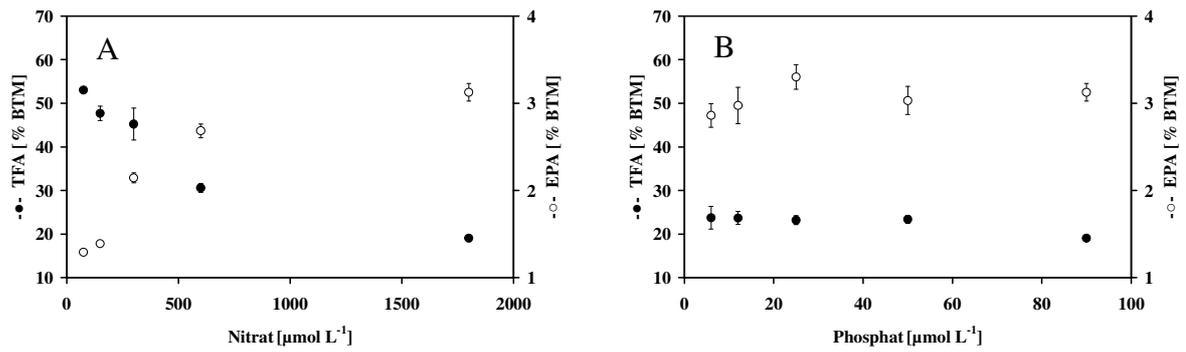


Abb. 3.5.9. Einfluss der (A) Nitrat- und (B) der Phosphatkonzentration auf die Konzentration der Gesamtfettsäuren TFA [% BTM] und der Eicosapentaensäure EPA [% BTM] in *N. salina*-Experimenten bei 21 °C unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

Bei 17 °C (Abb. 3.5.10.) hatte eine Phosphatlimitierung (P_6) ebenfalls keinen Einfluss auf die TFA-Konzentration bei Gegenüberstellung zur Referenzkultur bei gleicher Temperatur, jedoch nahm sie Einfluss auf den EPA-Gehalt. Im Vergleich zum Gehalt der Referenzkultur (3.5 %) war EPA [% BTM] in Kultur P_6 deutlich herabgesetzt (1.9 %) und sogar noch geringer als in der Kultur N_{75} (2.3 %).

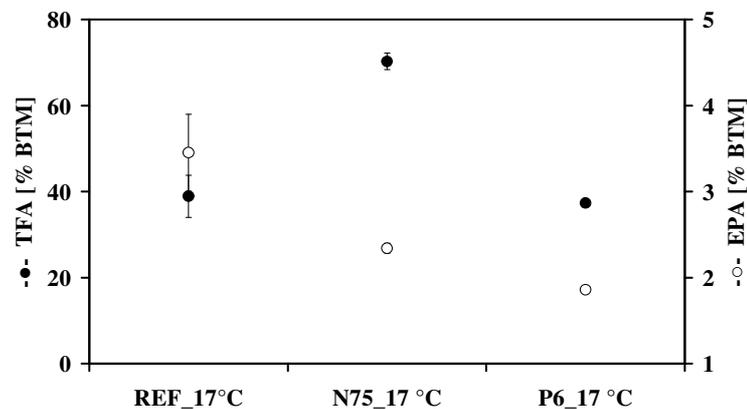


Abb. 3.5.10. Einfluss von Nitratlimitierung (N_{75}) und Phosphatlimitierung (P_6) auf die Konzentration der Gesamtfettsäuren TFA [% BTM] und der Eicosapentaensäure EPA [% BTM] von *N. salina* Kulturen bei 17 °C unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

3.5.4. Pigmente (Chlorophyll_a; Chl_a)

Stellvertretend für alle analysierten Pigmente (Violaxanthin, Vaucherixanthin, Zeaxanthin und β -Karotin) wurden in diesem Kapitel die stationären Endwerte von Chl_a aus den Kulturexperimenten mit *N. salina* betrachtet. Keiner der oben in Klammern stehenden Pigmente verhielt sich entgegengesetzt zum Chl_a.

Die Mikroalge *N. salina* hat, in dieser Arbeit bei vollem Nährstoffangebot (REF), ihre maximale Wachstumsgeschwindigkeit bei 26 °C. Zugleich enthielten diese Kulturen bei 26 °C auch mit 17 mg g⁻¹ den höchsten Chl_a-Gehalt (Abb. 3.5.11). Unterhalb und oberhalb der Kultivierungstemperatur von 26 °C fielen die Chl_a-Konzentrationen auf 10 mg [g BTM]⁻¹ ab.

Eine Nitratlimitierung beeinflusste den Chl_a-Gehalt noch stärker als die Temperatur (Abb. 3.5.11). Bei 17 °C, 21 °C und 26 °C und gleichzeitigem Nitratmangel waren die Chl_a-Konzentrationen um ein Vielfaches (5-, 23-, 10-fach) niedriger als die Werte in den Referenzkulturen (11, 13 und 17 mg [g BTM]⁻¹).

Während bei 21 °C keine Unterschiede in den Chl_a-Gehalten zwischen phosphatlimitierten Kulturen und Referenzkulturen zu analysieren waren, fand bei 17 °C eine Abnahme des Chl_a-Gehaltes in der phosphatlimitierten Kultur P₆ (8 mg [g BTM]⁻¹) im Vergleich zur Referenzkultur (11 mg [g BTM]⁻¹) statt.

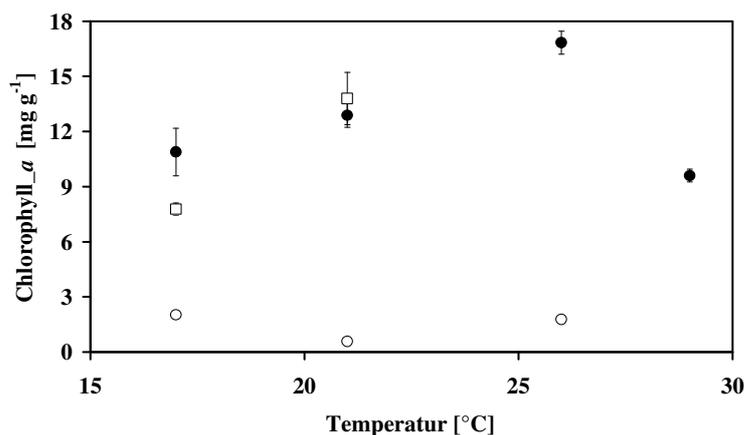


Abb. 3.5.11. Einfluss der Temperatur auf die BTM bezogene Chlorophyll_a-Konzentration von Kulturen (●) ohne Nitratlimitierung REF, (○) mit Nitratlimitierung N₇₅ und (□) mit Phosphatlimitierung unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h

Das Nitratangebot hatte, wie schon in *Abb. 3.5.11.* gezeigt, einen entscheidenden Einfluss auf die Chl_a-Konzentrationen. Das Verhältnis zueinander, bei Nitratkonzentrationen von 75 bis 1800 $\mu\text{M N L}^{-1}$, wird in *Abb. 3.5.12. A* dargestellt. Dabei ist eine direkte Proportionalität sowohl bei 21 °C als auch bei 26 °C gegeben.

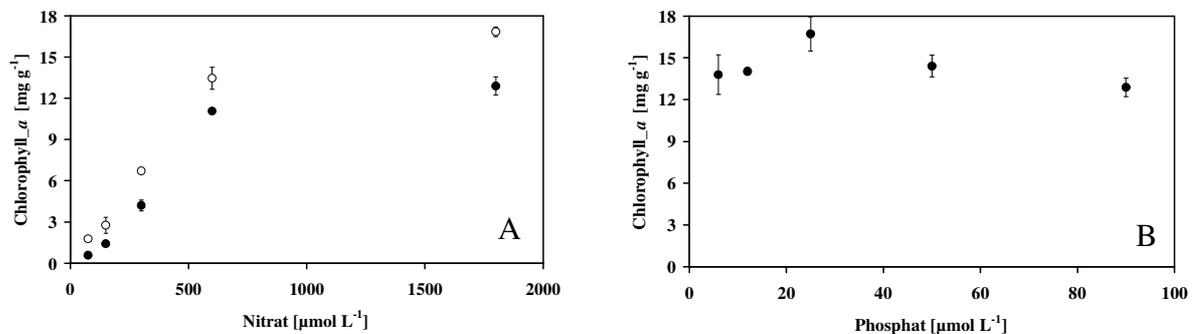


Abb. 3.5.12. Einfluss der (A) Nitratkonzentration bei (●) 21 °C bei (○) 26 °C und der (B) Phosphatkonzentration bei (○) 21 °C auf die BTM bezogene Chlorophyll_a-Konzentration von *N. salina*-Experimenten unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

Phosphatangebote von 6 bis 50 $\mu\text{M P L}^{-1}$ haben dagegen keinen anderen Effekt auf die Chl_a-Konzentration bei 21 °C (*Abb. 3.5.12. B*) als 90 $\mu\text{M P L}^{-1}$ auf die Referenzkultur. Die Unterschiede der Chl_a-Konzentrationen waren hier sehr gering.

3.5.5. α -Tocopherol

Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die α -Tocopherolproduktion in *N. salina* wurden bei 17 °C und 21 °C vorgenommen.

Dabei zeigte sich, dass die α -Tocopherolkonzentration in der Mikroalge *N. salina* durch einen Temperaturanstieg von 17 °C auf 21 °C (*Abb. 3.5.13.*), in der Referenzkultur (320 $\mu\text{g [g BTM]}^{-1}$) und in der nitratlimitierten Kultur N₇₅ (560 $\mu\text{g [g BTM]}^{-1}$), nahezu unbeeinflusst blieb.

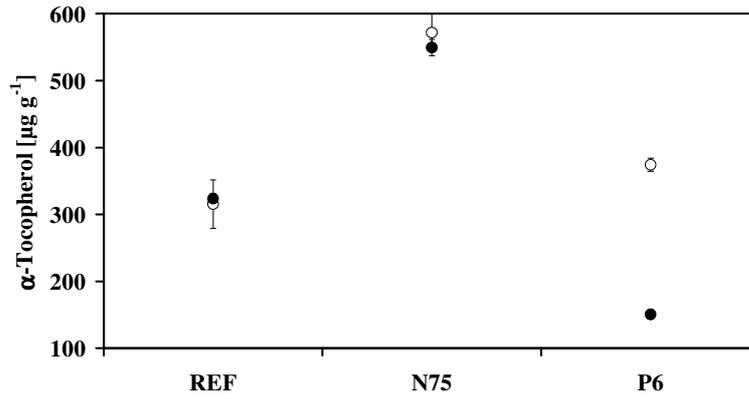


Abb. 3.5.13. Einfluss von Nitratlimitierung (N_{75}) und Phosphatlimitierung (P_6) auf die BTM bezogene α -Tocopherolkonzentration in *N. salina*-Experimenten bei (●) 21 °C und (○) 17 °C unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit. REF Referenz

Dagegen gab es in der phosphatlimitierten Kultur P_6 eine deutliche α -Tocopherol-Abnahme von 370 auf 150 $\mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ bei einer Temperaturerhöhung von 17 °C auf 21 °C.

In Abb. 3.5.14. ist der Einfluss verschiedener Nitrat- und Phosphatangebote auf den α -Tocopherolgehalt in *N. salina* dargestellt.

Nitratlimitierte Kulturen mit nur 75 und 150 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ produzierten mehr α -Tocopherol als Kulturen mit höheren Nitratangeboten (Abb. 3.5.14. A).

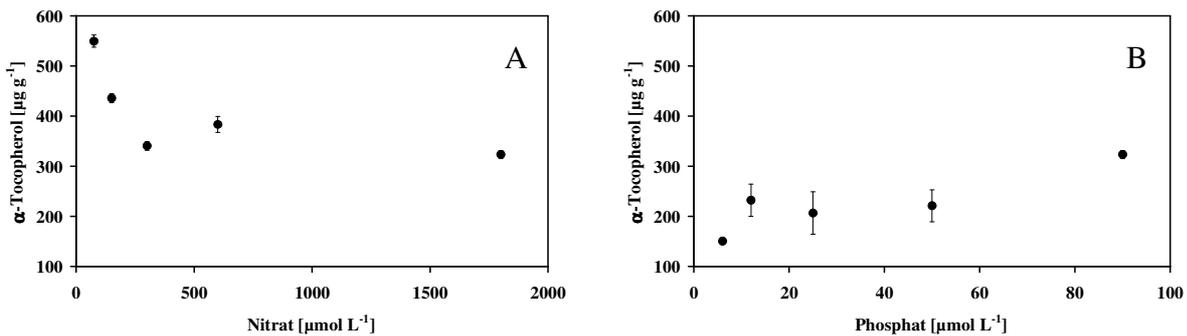


Abb. 3.5.14. Einfluss der (A) Nitrat- und der (B) Phosphatkonzentration bei 21 °C auf die BTM bezogene α -Tocopherolkonzentration in *N. salina*-Experimenten unter turbidostatischen Prozessbedingungen nach 350 h Prozesszeit.

Dem gegenüber zeigten phosphatlimitierte Kulturen mit einem Phosphatangebot von 6 bis 50 $\mu\text{mol P L}^{-1}$ eine abnehmende Tendenz im Vergleich zur Referenzkultur (Abb. 3.5.14. B). Demnach führte, in Gegenüberstellung zur Referenz, Stickstoffmangel in *N. salina*, unter in dieser Arbeit festgelegten turbidostatischen Prozessbedingungen ($\text{OD} = 1$; 21 °C) zu einer Anhebung der α -Tocopherolkonzentration, während es bei einem Phosphatmangel zu einer Absenkung kam.

3.5.6. On- und inline Fluoreszenz

3.5.6.1. Temperatureinfluss auf on- und inline Fluoreszenz

In Abb. 3.5.15. A, B sind die mit der PAM-Messtechnik (Kap. 2.3.1.) in- und online bestimmten Fluoreszenzsignale F der Kulturen bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Die Grundfluoreszenz F stieg, sowohl inline als auch online ermittelt, mit zunehmender Temperatur in den Referenzkulturen (bei PAM-inline bis 29 °C von 0.8 auf 2.9 r.E. (Abb. 3.5.15. A) und bei PAM-online bis 26 °C von 120 auf 270 r.E. (Abb. 3.5.15. B)).

In den nitratlimitierten Kulturen N_{75} wurden aufgrund unzureichender Signalverstärkung im Messgerät inline (Abb. 3.5.15. A) keine Grundfluoreszenzen (F) mehr detektiert. Jedoch konnten die F-Signale online erfasst werden (Abb. 3.5.15. B). Hier waren diese in den Kulturen N_{75} gegenüber den Referenzkulturen um das 4 bis 10-fache gesunken und hatten unabhängig von der Temperatur einen Wert von 30 r.E.

In den phosphatlimitierten Kulturen P_6 (Abb. 3.5.15.) wurden Fluoreszenzsignale bei 17 °C und 21 °C gemessen. Die inline (Abb. 3.5.15. A) und online (Abb. 3.5.15. B) ermittelten F-Signale zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Temperaturen. Im Vergleich zur Referenz aber gab es den Effekt einer Phosphatlimitierung. Dieser wurde deutlich bei 21 °C, durch die um 2- bis 3-fach gesunkenen F-Signale in den Kulturen P_6 (Abb. 3.5.15. A,B).

In Abb. 3.5.15. C und D ist die photochemische Effizienz ϕ_{PSII} , ermittelt aus F und F_M' nach Gleichung 2.1. (Kap. 2.3.1.), bei unterschiedlichen Temperaturen kultivierten Mikroalge *N. salina* dargestellt.

In den Referenzkulturen lagen, innerhalb des Temperaturbereiches von 21 °C bis 29 °C, bei inline (Abb. 3.5.15. C) wie auch online (Abb. 3.5.15. D) ermittelten photochemischen Effizienzen keine Änderungen vor ($\phi_{\text{PSII}} = 0.6$ r.E.). Indessen gab es Abweichungen zwischen

inline und *online* erhobenen photochemischen Effizienzen bei 17 °C. Während der ϕ_{PSII} *inline*-Wert von 17 °C auf 21 °C von 0.8 r.E. auf 0.6 r.E. sank, nahm ϕ_{PSII} der *online*-Wert von 0.5 r.E. auf 0.6 r.E. zu.

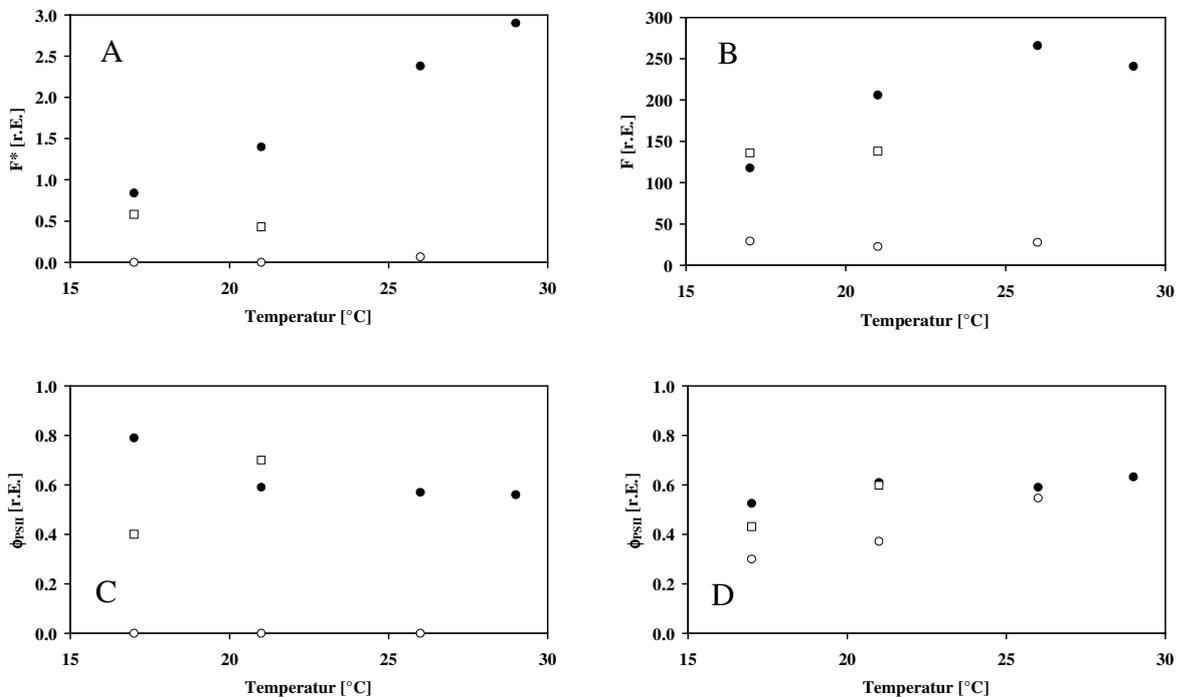


Abb. 3.5.15. Einfluss der Temperatur auf die (A) *inline* und (B) *online* Fluoreszenzsignale F und auf die (C) *inline* und (D) *online* ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII} . (●) Referenzkulturen REF; (○) nitratlimitierte Kulturen N₇₅; (□) phosphatlimitierte Kulturen P₆; (* normiert)

Bei phosphatlimitierten Kulturen nahm der *inline*- wie auch *online* ϕ_{PSII} -Wert einheitlich von 0.4 r.E. auf 0.7 r.E. bzw 0.6 r.E. zu (Abb. 3.5.15. C,D).

In den nitratlimitierten Kulturen N₇₅ war aufgrund der extrem geringen bzw. nicht mehr detektierbaren F-Signale bei der *inline* PAM-Messung keine Auswertung möglich (Abb. 3.5.15. A). Das bedeutet, dass in diesen Kulturen eine photochemische Effizienz von $\phi_{PSII} = 0$ angenommen werden kann (Abb. 3.5.15. C). Die aus den *online*-Fluoreszenzsignalen ermittelten photochemischen Effizienzen der Kulturen N₇₅ (Abb. 3.5.15. D) stiegen mit zunehmender Temperatur 0.3 r.E. bis 0.55 r.E. an.

Zusammenfassend (Abb. 3.5.15.) ist zu sagen, dass zunehmende Temperaturen bis 29 °C in den Referenzkulturen einen steigenden Einfluss auf die Grundfluoreszenz, jedoch keine nennenswerte Nachwirkung auf die photochemische Effizienz hatten. Auf die F-Signale der

nitrat- und phosphatlimitierten Kulturen hatte die Temperatur keinen Einfluss, aber einen steigenden Einfluss auf die photochemische Effizienz. Zusätzlich bewirkten Nährstofflimitierungen eine Abnahme der Fluoreszenzsignale.

3.5.6.2. Nitrateinfluss auf *on-* und *inline* Fluoreszenz

Ein zunehmendes Nitratangebot führte in den Kulturen bei 21 °C und 26 °C zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals F (Abb. 3.5.16. A, B). Dabei lagen die F-Signale der 26 °C-Kulturen, bei gleichem Nitratangebot, höher als die F-Signale der Kulturen bei 21 °C. Besonders deutlich wurde die Differenz in den F-Signalen beim Vergleich der Referenzkulturen (1800 µM N) (Abb. 3.5.16. A, B) bei 26 °C.

Der Einfluss von Nitrat bei 21 °C und 26 °C bzw. der Einfluss der Temperatur bei unterschiedlichen Nitratangeboten auf ϕ_{PSII} war marginal (Abb. 3.5.16. C, D). Die ϕ_{PSII} -Werte lagen in einem Bereich von 0.5 bis 0.6 r.E. Ausgenommen davon sind die ϕ_{PSII} -Werte (*in-* und *online*) der niedrigsten Nitratangebote (75 – 150 µM N) (Abb. 3.5.16. C, D).

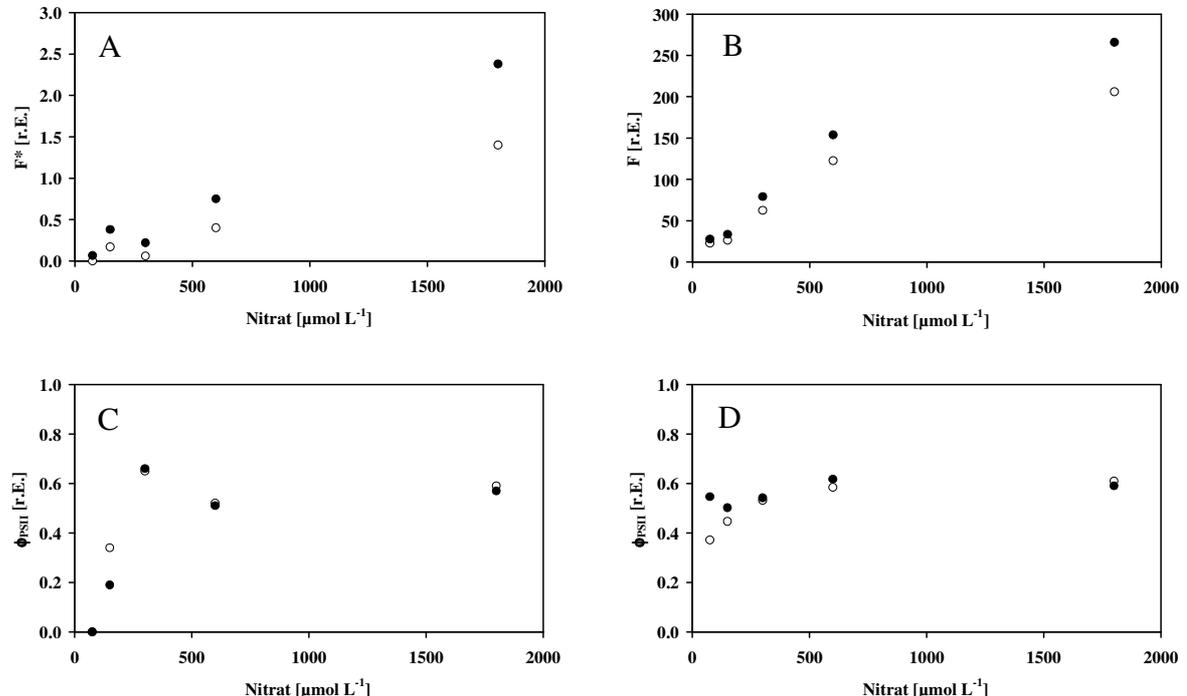


Abb. 3.5.16. Einfluss unterschiedlicher Nitratangebote auf die (A) inline und (B) online gemessenen Fluoreszenzsignale F und auf die (C) inline und (D) online ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII} . 26 °C (●), 21 °C (○); (* normiert)

3.5.6.3. Phosphateinfluss auf *on*- und *inline* Fluoreszenz

Die Einflussnahme unterschiedlicher Phosphatangebote auf das Fluoreszenzsignal F (Abb. 3.5.17. A, B) und auf die photochemische Effizienz (Abb. 3.5.17. C, D) war sehr gering.

Erst eine Phosphatkonzentration, die einem doppelt konzentrierten F/2-Medium für Phosphat (REF) entsprach, bewirkte eine Anhebung des normierten F-Signals von 0.8 r.E. auf 1.4 r.E. (Abb. 3.5.17. A) bzw. von 150 r.E. auf 200 r.E. (Abb. 3.5.17. B), blieb jedoch bei der photochemischen Effizienz (Abb. 3.5.17. C, D), mit Werten von $\phi_{PSII} = 0.6$ bis 0.7 r.E., ohne Wirkung. Im Vergleich zu den F-Signalen der nitratlimitierten Kulturen, die in einem Bereich zwischen 0 bis 0.4 r.E. lagen (Abb. 3.5.17. A, B), fielen die Werte der phosphatlimitierten Kulturen (Abb. 3.5.17. A, B) in einem Bereich von 0.4 bis 0.8 r.E. und damit höher aus.

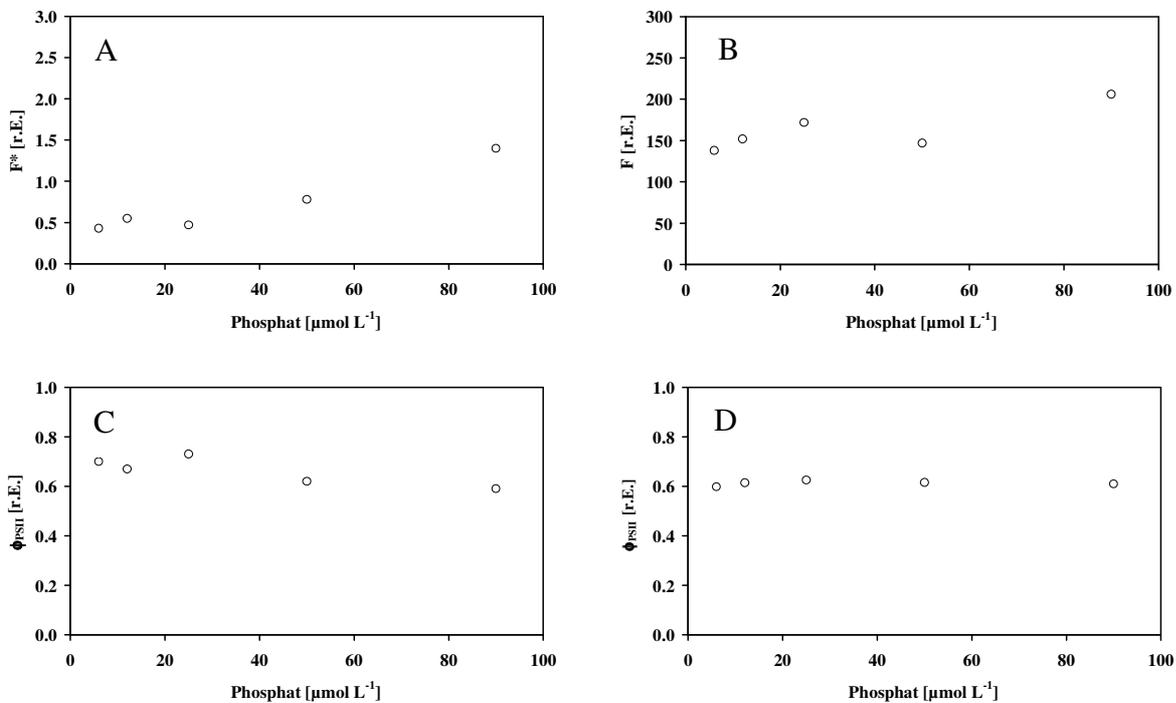


Abb. 3.5.17. Einfluss unterschiedlicher Phosphatangebote auf die (A) inline und (B) online gemessenen Fluoreszenzsignale F und auf die (C) inline und (D) online ermittelte photochemische Effizienz ϕ_{PSII} . 21 °C (\circ); (* normiert)

3.5.7. Produktivität von Gesamtfettsäuren (TFA) und Eicosapentaensäure (EPA)

In Abb. 3.5.18. und Abb. 3.5.19. sind die Produktivitäten (Kap. 2.5., Gleichung 2.3.) von TFA und EPA von allen, hier in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit *N. salina* dargestellt.

Die höchsten Produktivitäten an TFA (Abb. 3.5.18.) wurden von den Kulturen mit hoher Stickstoffversorgung bei 17 °C und 21 °C, d.h. unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur (26 °C) erbracht. Demnach erzielten die Referenzkulturen REF_17 °C (20.2 mg L⁻¹ d⁻¹) und REF_21 °C (17.2 mg L⁻¹ d⁻¹) sowie die Kultur N₆₀₀_21 °C (16.2 mg L⁻¹ d⁻¹) die größten TFA-Produktivitäten, während stark nitratlimitierte Kulturen (N₇₅ – N₃₀₀) deutlich niedrigere Produktivitäten (3.4 – 12.7 mg L⁻¹ d⁻¹) aufwiesen. Der Einfluss limitierter Phosphatangebote war nahezu konstant und unabhängig von der Phosphatkonzentration. Die Produktivität an TFA lag hier zwischen 11 und 14 mg L⁻¹ d⁻¹.

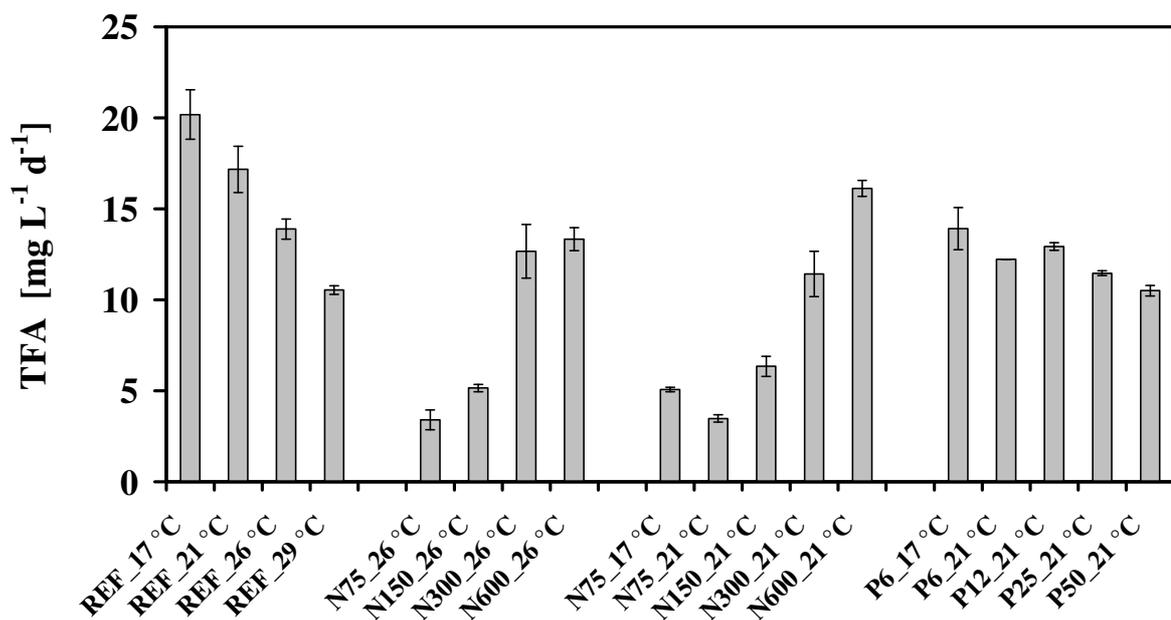


Abb. 3.5.18. Überblick der TFA-Produktivitäten [mg L⁻¹ d⁻¹] aller Experimente mit verschiedenen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium in Kombination mit verschiedenen Temperaturen. REF Referenzkultur; N₇₅ - N₆₀₀ verschiedene Nitratangebote; P₆ – P₅₀ verschiedene Phosphatangebote

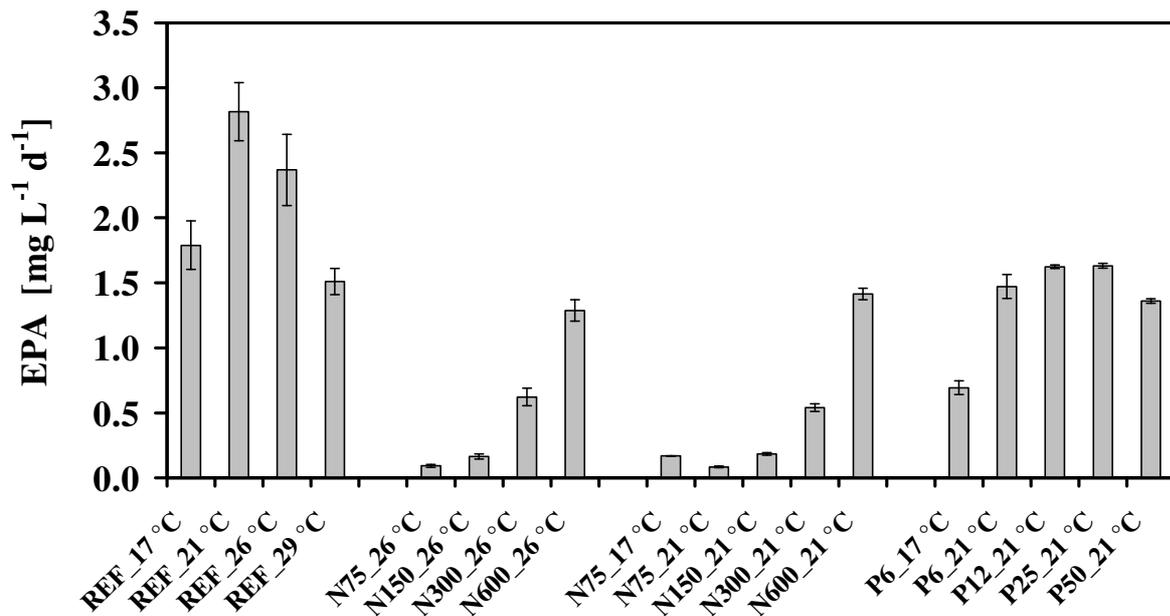


Abb. 3.5.19. Überblick der EPA-Produktivitäten [mg L⁻¹ d⁻¹] aller Experimente mit verschiedenen Nitrat- und Phosphatangeboten im Medium in Kombination mit verschiedenen Temperaturen. REF Referenzkultur; N₇₅ - N₆₀₀ verschiedene Nitratangebote; P₆ - P₅₀ verschiedene Phosphatangebote

Die Produktivität von EPA (Abb. 3.5.18.) war in den Kulturen REF_21 °C mit 2.8 mg L⁻¹ d⁻¹ und REF_26 °C mit 2.4 mg L⁻¹ d⁻¹ von allen erhaltenen Produktivitäten die höchste. Dabei glich die Referenzkultur_21 °C mit dem höheren EPA-Gehalt (Abb. 3.5.4. A) die im Vergleich zur Referenzkultur_26 °C niedrigere Wachstumsrate (Abb. 3.5.1.) aus. Unterhalb dieser Temperaturen, d.h. bei 17 °C, ging die EPA-Produktivität (Abb. 3.5.18.) aufgrund der sehr geringen Wachstumsrate in der Referenzkultur zurück. Nitratlimitierungen führten, noch stärker als bei den TFA-Produktivitäten (Abb. 3.5.18.), zu einem Rückgang der EPA-Produktivitäten (0.1 – 1.4 mg L⁻¹ d⁻¹). Ebenfalls erniedrigte EPA-Produktivitäten (1.4 – 1.6 mg L⁻¹ d⁻¹) folgten nach Phosphatlimitierungen bei 21 °C, ungeachtet der Höhe der Phosphatlimitierung.

Die hier präsentierten Daten geben einen Hinweis darauf, dass die Umweltparameter, die eine hohe EPA-Produktivität bewirken, gleichzeitig für eine hohe Biomasseproduktivität verantwortlich sind.

4. DISKUSSION

In den folgenden Kapiteln werden die in den *Kap. 3.1.* bis *3.5.* vorgestellten Ergebnisse diskutiert. Diese kritische Auseinandersetzung mit den in turbidostatischen Prozessen erzielten Resultate sollen helfen, die physiologischen Antworten von *N. salina* bei variierenden Stickstoff- und Phosphatkonzentrationen in Kombination mit unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen einzuschätzen.

In *Tab. 4.1.* werden die Effekte der Parameter Nitrat, Phosphat und Temperatur auf die Mikroalge *N. salina* und ihre Interpretation zusammengefasst, während in *Tab. 4.2.* die dominierenden Stressoren bei Parameterkombinationen dargestellt werden.

4.1. Adaptionphase (21 °C und 17 °C)

Beim Übersetzen der im diskontinuierlichen „batch“-Verfahren durchgeführten Vorkulturen von *N. salina* in die turbidostatische Kulturführung kommt es zu einer plötzlichen Änderung der Kultivierungsparameter. Dieses führt zu zellulären Anpassungsreaktionen, welche durch eine Dynamik im zeitlichen Verhalten einzelner physiologischer Parameter (z.B. Fluoreszenzsignale F und F_M , Pigment- und α -Tocopherolkonzentrationen) sichtbar werden (z.B. *Abb. 3.1.1. – 3.1.8;* *Abb. 3.2.1. – 3.2.4.;* *3.2.6. – 3.2.8.*). Diese Anpassungsphasen dauerten je nach Vorkultur und Parameter (17 °C; 21 °C) 50 - 120 h bei einer Gesamtlaufzeit der Reaktorexperimente von 350 h.

Aufgrund der diskontinuierlich betriebenen Vorkulturen variieren die Metabolitenkonzentrationen (z.B. Chlorophyll_a, α -Tocopherol) in den Zellen, welche sich in den unterschiedlichen Startwerten der turbidostatischen Prozesse widerspiegeln. Diese sind für die schwach abweichenden Ausprägungen der Adaptionphasen (vgl. *Abb. 3.1.16.A* mit *Abb. 3.1.16.B*) verantwortlich.

Eine untergeordnete Rolle für den Verlauf der Adaptionphasen scheinen Änderungen des pH-Wertes (Hoshida et al. 2005; Hu & Gao 2006) und der Salinität (Abu-Rezq et al. 1999, Lubián et al. 2000; Hu & Gao 2006) des Mediums zu spielen. Die Ergebnisse der Nährstoffexperimente (*Kap. 3.1.;* *3.2.*) deuten ebenfalls auf einen geringfügigen Einfluss des Nitrat- sowie des Phosphatangebotes während der turbidostatischen Experimente auf die Adaptionphase hin. Nitrat- und phosphatinduzierte Effekte auf die Zellphysiologie treten

erstmalig nach diesen Anpassungsphasen in den Vordergrund. Deutliche Unterschiede sind letztendlich am Prozessende sichtbar (z.B. *Abb. 3.1.11. – 3.1.19. Abb. 3.2.7. – 3.2.11.*).

*Tab. 4.1. Überblick über parameterinduzierte Effekte auf *N. salina* während turbidostatischer Prozesse*

	Temperatur	Phosphat	Stickstoff
μ [d ⁻¹]	Schwach neg.	Schwach neg. Konz. unabh.	Stark neg. Konz. abh.
TFA [% BTM]	Stark neg.	Schwach neg. Konz. unabh.	Stark pos. Konz. abh.
EPA [% BTM]	Stark neg.	Schwach neg. Konz. unabh.	Stark neg. Konz. abh.
TFA [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Stark neg.	Schwach neg. Konz. unabh.	Stark neg. Konz. abh.
EPA [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Stark neg.	Schwach neg. Konz. unabh.	Stark neg. Konz. abh.
Chl _a [mg g ⁻¹]	Schwach neg.	Kein Einfluss	Stark neg. Konz. abh.
α -Toc [μ g g ⁻¹]	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Kein Einfluss
$\phi_{\text{PSII}}_{\text{online}}$ [r.E.]	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Schwach neg. Konz. abh.

*Tab. 4.2. Überblick über Parameterkombinationen und deren bestimmender Stressor in *N. salina* während turbidostatischer Prozesse*

	Temperatur+ Stickstoff	Temperatur+ Phosphat
μ [d ⁻¹]	N dominant	Temp. dominant
TFA [% BTM]	N dominant	Temp. dominant
EPA [% BTM]	N dominant	Temp. dominant
TFA [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	N dominant	Kein Einfluss
EPA [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	N dominant	Temp. dominant
Chl _a [mg g ⁻¹]	N dominant	Temp. dominant
α -Toc [μ g g ⁻¹]	Kein Einfluss	Kein Einfluss
$\phi_{\text{PSII}}_{\text{online}}$ [r.E.]	N dominant	Temp. dominant

Vielmehr sind für diese Anpassungsphasen der Gattung *Nannochloropsis* die Faktoren Lichtverfügbarkeit (Fisher et al. 1996; Gentile & Blanch 2001; Lubián et al. 2000) und Temperatur von Bedeutung (Sukenik et al. 1993b; Gentile & Blanch 2001; Hu & Gao 2006). Betrachtet man z.B. die *in-* und *online* bestimmten Fluoreszenzsignale F und F_M' während der Anpassungsphase in den ersten 50 – 100 h der turbidostatischen Prozesse bei 17 °C (Abb. 3.2.1.; 3.2.3.) und 21 °C (Abb. 3.1.1.; 3.1.5.), so ist festzustellen, dass die Temperaturunterschiede keine deutlichen zeitlichen Verschiebungen der Adaptionphasen der Fluoreszenzsignale bewirken.

Der Verlauf der Anpassung im Fluoreszenzsignal F (Abb. 3.1.1.; 3.1.5.) ähnelt jedoch nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, dem konstanten Verlauf der Chl_a-Konzentrationen (Abb. 3.1.11.) in den ersten 120 h der Versuche bei 21 °C. Während also Chl_a bei 21 °C (Abb. 3.1.11.) keine Adaptionphase zeigt, führt eine Temperaturänderung von 22 °C (Vorkultur) auf 17 °C zu abnehmenden Chl_a-Konzentrationen (Abb. 3.2.7.) in der Adaptionszeit. Dieses Phänomen der unterschiedlichen Verläufe der F-Werte und Chl_a-Konzentrationen wird in Kap. 4.3. diskutiert.

Abnehmende Chl_a-Konzentrationen bei sinkenden Temperaturen sind vermutlich auf eine zurückgehende Aktivität von Enzymen für deren Synthese zurückzuführen (Gentile & Blanch 2001). Zusätzlich könnte eine mit der Temperatur rückläufige Nitrataufnahme (Abb. 3.5.3. A) sinkende Chl_a-Konzentrationen hervorrufen.

Ausgehend von den oben angeführten Ausführungen sind die Änderungen der Lichtverhältnisse als der entscheidende Faktor für Adaptionphasen anzunehmen. Bei der Überführung der „batch“-Kulturen in die Reaktoren kommt es zu einer Erhöhung des Lichtintensität/ Zelle-Verhältnisses, da zum einen die Intensität von 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kap. 2.1.) erhöht wird und zum anderen die Lichtverfügbarkeit aufgrund geringerer Zelldichte in den Reaktoren im Vergleich zu den Vorkulturen ansteigt.

Untersuchungen mit *Nannochloropsis gaditana* (Gentile & Blanch 2001) und *Nannochloropsis* sp. (Fisher et al. 1996) bei verschiedenen Lichtintensitäten haben gezeigt, dass diese Spezies in der Lage sind, die Antennengröße der LHC unterschiedlichen Lichtintensitäten anzupassen. Die zeitlichen Verläufe der Chlorophyll- und Violaxanthinkonzentrationen in den ersten 120 h der Experimente (Abb. 3.1.11., 3.1.12., 3.2.7.) deuten darauf hin, dass *N. salina* ebenfalls in der Lage ist, sich an neue Lichtbedingungen durch Änderungen der Antennengrößen anzupassen.

Veränderte Lichtverhältnisse haben aber nicht nur Auswirkungen auf die Pigmentkonzentration - sie beeinflussen auch die Produktion von α -Tocopherol in Mikroalgen (Abe et al. 1999; Kusmic et al. 1999). Grasses et al. (2001) und Shigeoka et al. (1986) zeigen, dass der α -Tocopherolgehalt in den Chloroplasten höherer Pflanzen und in der Frischwassermikroalge *Euglena gracilis* durch ansteigende Lichtintensitäten erhöht wird, um sich vor entstehendem photooxidativen Schaden in der Thylakoidmembran zu schützen (Fryer 1992, Trebst 2003; Carballo-Cárdenas et al. 2003). Auch in *Synechocystis* sp. PCC 6803 erhöht sich der α -Tocopherolgehalt bei höherer Lichtverfügbarkeit (Backasch et al. 2005). Die Ergebnisse aus den turbidostatischen Experimenten mit *N. salina* zeigen jedoch eine gegensätzliche Tendenz (Abb. 3.1.16., 3.2.8.). Nach dem Übersetzen der Vorkulturen in die Reaktoren waren die Zellen einem höheren Lichtangebot ausgesetzt. Das nun höhere Licht/Zelle-Verhältnis führt zu einer starken Abnahme der α -Tocopherolkonzentration (Abb. 3.1.16.; 3.2.8.). Dieses Verhaltensmuster einer negativen Korrelation zwischen Tocopherolgehalt und Lichtintensität wurde ebenfalls in der Mikroalge *Dunaliella tertiolecta* beobachtet (Barbosa et al. 2005).

E. gracilis und *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie *N. salina* und *D. tertiolecta* reagieren bezüglich ihrer Tocopherolbildung unterschiedlich auf Lichteinflüsse. Daher ist anzunehmen, dass sie sich in ihren photo-protektiven Mechanismen unterscheiden. Wie in *D. tertiolecta* (Barbosa et al. 2005) wird hier bei *N. salina* angenommen, dass die Rolle von α -Tocopherol nicht auf den Schutz des PS-Apparates gegen photooxidative Schäden beschränkt ist, da seine Produktion nicht durch Licht stimuliert wurde. Demnach scheinen Stressparameter, wie z.B. Zellalterung bzw. Seneszenz, zu einer Steigerung des α -Tocopherolgehaltes zu führen (Carballo-Cárdenas et al. 2003).

Eine zunehmende α -Tocopherolproduktion mit zunehmendem Alter der Kulturen hängt vermutlich mit dem Bedarf an Antioxidantien während des Alterungsprozesses von Mikroalgen zusammen. Daher könnte die Produktion von α -Tocopherol möglicherweise eine Abwehrreaktion der Zellen vor altersbedingten Schäden sein (Donato et al. 2003; Durmaz 2007).

4.2. Biologische Trockenmasse (BTM) und Wachstumsrate (μ)

Erste Hinweise auf die Vitalität von Mikroalgen in Kultivierungsexperimenten können die Ergebnisse der biologischen Trockenmasse und der Wachstumsrate geben. Im

turbidostatischen Prozess hingegen können anhand von Biomassen keine Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gezogen werden, da die BTM über die optische Dichte als einstellbarer Parameter festgelegt wird. In dieser Arbeit war es von entscheidender Bedeutung, die BTM innerhalb den Kulturen gering und zwischen ihnen konstant zu halten, um Effekte von Temperatur und Nährstoffangebot zu untersuchen. Der Mittelwert aller erhobener BTM-Werte in dieser Arbeit liegt durchschnittlich bei $0.18 (\pm 0.02) \text{ g L}^{-1}$ (Abb. 3.1.9.; 3.2.5.; 3.3.4.). Die daraus erkennbare geringe Zelldichte gewährleistet eine homogene Lichtverfügbarkeit und eine Minimierung der Selbstbeschattung. Gleichzeitig beweist die geringe Abweichung innerhalb aller Kultivierungsexperimente, dass der Turbidostat funktioniert hat und dass demnach unterschiedliche Licht/ Zelle-Verhältnisse ausgeschlossen werden können. Weiterhin kann somit sichergestellt werden, dass erzielte Effekte auf die eingestellten Parameter zurückzuführen sind.

Das „batch“-Verfahren, als die am häufigsten eingesetzte Kultivierungsstrategie, kann erste Hinweise bezüglich physiologische Reaktionen auf Umweltveränderungen geben. Jedoch weichen die Effekte von Parametern wie z.B. Temperatur, Nährstoffe oder Alter der Kultur in Kombination mit Licht auf eine „batch“-Kultur, größtenteils von den Effekten, die diese Parameter auf eine turbidostatisch geregelte Kultur haben, ab.

Während die BTM im Reaktor in einem turbidostatischen Prozess konstant bleibt (Abb. 3.1.9.; 3.2.5.), wird die Wachstumsrate aus dem zugeführten Volumen an Frischmedium in einem definierten Zeitintervall (Gleichung 2.2.) ermittelt. Spezies der Gattung *Nannochloropsis* belegen durch ihr Wachstumsverhalten zwischen $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eine große Temperaturtoleranz (Sukenik 1991; Chini-Zittelli 1999). Verschiedene *Nannochloropsis*-Stämme zeigen ein optimales Wachstumsverhalten zwischen $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (James et al. 1989; Sukenik 1991; Seto et al. 1992; Sukenik et al. 1993b). In vorliegender Arbeit konnten maximale Wachstumsgeschwindigkeiten ($\mu = 0.53 \text{ d}^{-1}$) in *N. salina*-Kulturen bei $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ festgestellt werden (Abb. 3.5.2. A). Oberhalb und unterhalb dieser Temperatur fielen die Wachstumsraten wieder (Abb. 3.5.1) (Sukenik 1991; Sukenik et al. 1993b).

Bei einer Kombination der Parameter Temperatur und Nitratlimitierung wird jedoch deutlich, dass die Limitierung von Nitrat einen größeren Einfluss auf die Wachstumsraten von *N. salina* hat als die Temperatur (Abb. 3.5.1.).

Folgende Arbeiten weiterer Autoren geben Wachstumsraten von *Nannochloropsis* sp. an, die ohne Nährstofflimitierung verschiedenen Wachstumstemperaturen ausgesetzt waren. Sukenik et al. (1991) gibt Wachstumsraten bei $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0.49 d^{-1} und 0.81 d^{-1} an. Diese

liegen im Vergleich zu den Wachstumsraten dieser Arbeit bei 17 °C und 26 °C mit 0.32 d⁻¹ und 0.53 d⁻¹ (Abb. 3.5.1.) höher. Ebenfalls größer als in dieser Arbeit sind die Wachstumsraten von Kulturen, die in einem Licht/ Dunkel-Zyklus bei 18 °C, 23 °C und 29 °C (0.44 d⁻¹, 0.72 d⁻¹ und 0.6 d⁻¹) kultiviert werden (Sukenik & Carmeli 1990; Sukenik 1991). Die Gründe dafür liegen nicht in einer verminderten Vitalität der *N. salina*-Kulturen aus dieser Arbeit, sondern in der Prozessstrategie. Hier stehen sich ein kontinuierlicher Prozess eines Turbidostaten und ein diskontinuierlicher „batch“-Prozess gegenüber. Das heißt, die Wachstumsraten in einer „batch“-Kultur, ermittelt in der exponentiellen Wachstumsphase, werden unter gleichen Nährstoff- und Temperaturbedingungen immer höher liegen als die Wachstumsraten, die aus einer turbidostatischen Kultur herangezogen werden.

Das gleiche gilt für den Vergleich von Wachstumsraten von Kulturen, die unter verschiedenen Nitrateinflüssen standen. Als Beispiel ist die exponentielle Wachstumsrate von *Nannochloropsis oculata* mit 0.5 d⁻¹ (18 °C, 100 µM N) (Flynn et al. 1993) deutlich höher als die stationäre Wachstumsrate von 0.08 d⁻¹ (21 °C, 150 µM N; Abb. 3.1.10.A) bzw. 0.32 d⁻¹ (17 °C, 1800 µM N; Abb. 3.2.6.). Die hohe Wachstumsrate von *N. oculata* bei 18 °C und geringer Nitratversorgung lässt darauf schließen, dass die optimale Wachstumstemperatur dieser Alge niedriger ist als bei *N. salina*. Weitere Angaben von exponentiellen Wachstumsraten unter verschiedenen Nitrateinflüssen werden von Sukenik (1991) gemacht. In seiner Arbeit bewirkten Nitratangebote von 75 µM N bis 1200 µM N bei 25 °C in *Nannochloropsis* sp. größere Wachstumsraten als die Wachstumsraten bei vergleichbaren Konzentrationen in dieser Arbeit (Abb. 3.5.2.A). Anhand dieser Beispiele wird wiederholt sichtbar gemacht, dass Wachstumsraten bei annähernd gleichen Umweltbedingungen, aber unterschiedlichen Prozessführungen abweichende Ergebnisse anzeigen.

Zusammenfassend wird jedoch deutlich, dass bei einer Kombination der Parameter Temperatur und Nitratlimitierung Letzteres einen größeren Einfluss auf die Wachstumsraten von *N. salina* hat (Abb. 3.5.1.).

Der Einfluss von Phosphat auf die Wachstumsrate von *N. salina* war im Vergleich zu Nitrat gering. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten (0.28 ± 0.01 d⁻¹; Abb. 3.5.2.B) innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 6 µM P bis 50 µM P (entspr. F/2-Medium). Eine Zunahme der Wachstumsrate auf 0.42 d⁻¹ fand erst mit einer Phosphatkonzentration von 90 µM P statt (Abb. 3.5.2. B). In Kultivierungsexperimenten mit *Nannochloropsis gaditana* (Forján et al. 2007) liegen die exponentiellen Wachstumsraten bei phosphatlimitierten (6 µM P) und mit F/2-Medium (45 µM P) versorgten Kulturen mit 0.7 d⁻¹ und 1.0 d⁻¹ erheblich höher. Anhand dieser Daten gibt es bereits einen Einfluss bei 50 µM

Phosphat gegenüber der stark limitierten Kultur. Auch an diesem Beispiel wird deutlich, dass neben der Wahl der *Nannochloropsis*-Spezies die Art der Kulturführung entscheidend ist für die Resultate der Wachstumsrate.

4.3. Pigmente und Fluoreszenzsignale

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss unterschiedlicher Nitrat- und Phosphatangebote sowie der Einfluss der Temperatur auf die Pigmentkonzentration diskutiert. Gleichzeitig werden in diesem Zusammenhang die durch o.g. Umweltparameter hervorgerufenen physiologischen Veränderungen anhand von Fluoreszenzsignalen betrachtet.

Erwartungsgemäß beeinflussen Nitrat- und Phosphatlimitationen die Konzentration von Makromolekülen und die spezifische Aktivität von Enzymen und Ribosomen (Geider et al. 1998). Dabei ist Stickstoff ein Schlüssel für strukturelle und katalytische Komponenten, wohingegen Phosphor bei der Energiebereitstellung durch energiereiche Phosphatbindungen und bei der intrazellulären Signalgebung (Phosphorylierung und Dephosphorylierung) eine wichtige Rolle spielt (Geider et al. 1998).

In photosynthetisch aktiven Zellen stellen Pigmente die Versorgung der Reaktionszentren mit Lichtenergie sicher und schützen den Photosyntheseapparat in Stresssituationen. Für das Wachstum der Zelle und bei den damit verbundenen biochemischen Prozessen nimmt der Photosyntheseapparat eine Schlüsselstellung ein (Huner et al. 1996).

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit geht hervor, dass sich stickstoff- und phosphatinduzierte Effekte auf die Zellphysiologie von *N. salina* deutlich unterscheiden (z.B. Abb. 3.1.11.; Abb. 3.2.7.).

4.3.1. Chlorophyll_a und Fluoreszenzsignale bei Nitratmangel

Die Abnahme von Chl_a (Abb. 3.1.11.; Abb. 3.2.7.A; Abb. 3.3.6.A) in nitratlimitierten Zellen geht mit der Abnahme von F und F_M' (Abb. 3.1.2.A, 3.1.3.A; Abb. 3.1.6.A, 3.1.7.A; Abb. 3.2.1.; Abb. 3.3.1. A, B, 3.3.3. A, B) im zeitlichen Verlauf der Experimente einher.

Bei einem Nitratmangel geht die Synthese von stickstoffhaltigen Molekülen wie Chl_a oder Proteinen zurück (Berges et al. 1996; Forjan et al. 2007). Damit sind auch die Abnahme der Anzahl der Rubisco-Enzyme (Sauer et al. 2001) und die Reaktionen, die in den Calvin-Zyklus involviert sind, verbunden. Der daraus resultierende Rückgang des ATP-Bedarfs für die

betroffenen Synthesewege in der Zelle führt letztendlich zu einem Anstieg des transthylakoidalen pH-Gradienten (Vanselow 1993; Lippemeier et al. 2001). Ein erhöhter pH-Gradient wiederum kann als Quencher für die Fluoreszenzsignale F und F_M' wirken (Dau 1994). Jedoch ist dieser Vorgang nur unmittelbar nach Prozessänderungen (z.B. Erhöhung der Lichtintensität) bis zu einigen Minuten (Vanselow 1993; Dau 1994; Bendixen 1998) detektierbar. Dieser Prozess kann demnach nicht bei stationären Langzeitprozessen (350 h), wie sie in vorliegender Arbeit stattgefunden haben, als Erklärung für das Absinken von F und F_M' herangezogen werden. Vielmehr könnte die abnehmende Chl_a-Konzentration für den Abfall der Fluoreszenzsignale verantwortlich sein. Dieses könnte mit der Verteilung des gesamten Chl_a in den Zellen von *N. salina* in Zusammenhang gebracht werden. Demnach besitzen die Reaktionszentren von *N. salina* nur 14 % des gesamten in der Zelle vorkommenden Chlorophylls, der überwiegende Teil an Chlorophyll-Molekülen ist in den LHC assoziiert (Brown et al. 1987).

Die photochemische Effizienz ϕ_{PSII} zeigt im Gegensatz zu den Chl_a-Änderungen und zu den Änderungen der Fluoreszenzsignale F und F_M' einen anderen Verlauf (Abb. 3.1.4. A, 3.1.8. A; Abb. 3.2.2.; Abb. 3.3.1. C, 3.3.3. C). Nach $t = 150$ h bleiben die ϕ_{PSII} -Werte konstant, wobei die stärksten N-Limitierungen die niedrigsten ϕ_{PSII} -Werte in *N. salina* bewirken (Abb. 3.1.4. A).

Das Abfallen der photochemischen Effizienz in nitratlimitierten Zellen gibt Hinweise auf die Zerstörung des Photosystems II (Verhoeven et al. 1997; Huner et al. 1996), da eine Stickstofflimitierung die zwei Photosysteme PSI und PSII unterschiedlich beeinflusst (Rhiel et al. 1986; Kolber et al. 1988). Während das PSI offensichtlich nicht von einem nitratlimitierten bedingten Proteinabbau betroffen ist, wird das PSII durch den Rückgang der Proteine in den Reaktionszentren stark beeinflusst (Kolber et al. 1988; Berges et al. 1996). Die Gründe für den selektiven Effekt einer N-Limitierung auf PSII haben möglicherweise mit dem schnellen „turn-over“ der D1- und D2-Proteine zu tun, im Vergleich zu den stabileren Proteinen im PSI (Plumley et al. 1989). Obwohl die Stickstofflimitierung nicht die Protein-„turn-over“-Raten selbst beeinflusst, werden die Proteine mit schnellen „turn-over“-Raten durch die aufgrund des N-Mangels zurückgehende Proteinsynthese stark beeinträchtigt (Berges et al. 1996; Sauer et al. 2001). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die je nach eingesetzter Nitratkonzentration gemessenen Verläufe von ϕ_{PSII} .

Je niedriger die eingesetzten Nitratkonzentrationen, desto niedriger sind die konstant verlaufenden ϕ_{PSII} -Werte. Der konstante Verlauf von ϕ_{PSII} (Abb. 3.1.4. A, 3.1.8. A; Abb. 3.2.2.;

Abb. 3.3.1. C, 3.3.3. C) lässt aber keine eindeutigen Rückschlüsse zu, in welchem Verhältnis PSII und ETC geschädigt werden. Die Konstanzhaltung von ϕ_{PSII} nach $t = 150$ h bis zum Prozessende nach $t = 350$ h (Abb. 3.1.4. A, 3.1.8. A; Abb. 3.2.2.; Abb. 3.3.1. C, 3.3.3. C) deutet aber auf die Ausbildung eines je nach verwendeter Nitratkonzentration abhängigen Gleichgewichtszustandes der linearen Elektronen-Transport-Aktivität hin.

4.3.2. Karotenoide bei Nitratmangel

Die im vorherigen Kapitel diskutierten Änderungen der Fluoreszenzsignale (F und F_M'), ϕ_{PSII} und Chl_a gehen mit Stresssituationen einher, denen *N. salina* ausgesetzt ist.

Die Abnahme der photochemischen Effizienz ist begleitet durch die Zunahme von Superoxiden (Jin & Tao 2000). Bei einem hohen Reduktionsgrad des Ferredoxins besteht die Möglichkeit, dass Elektronen von PSI unter Bildung des Superoxidradikals auf Sauerstoff übertragen werden (Heldt 1996). Weiterhin wird vermutet, dass eine übermäßige Anregung des PSII zu einem Anstau von Plastohydrochinon führt und Chl_a daraufhin durch weiterhin ankommende Exitonen vermehrt in einen Triplettzustand übergehen kann. Dieser kann zur Bildung weiterer Superoxidradikale (Singulett-Sauerstoff) beitragen (Heldt 1996).

Demnach scheinen phototrophe Organismen bei Nitratlimitation einem erhöhten photooxidativen Stress ausgesetzt zu sein und es liegt die Vermutung nahe, dass deshalb vermehrt Antioxidantien bzw. nicht-photochemisch aktive Pigmente wie Karotenoide und Xanthophylle gebildet werden (Khamis et al. 1990; Berges et al. 1996; Geider et al. 1998).

Für das Pigment Vaucherixanthin (Vaux) sind protektive Eigenschaften gegen photooxidativen Stress bisher nicht in der Literatur beschrieben und die abnehmende Vaux-Konzentration (Abb. 3.1.13.) könnte darauf hindeuten, dass Vaux keine Schlüsselrolle in *N. salina* im Schutz gegen photo-oxidativen Stress zukommt. Gleichwohl ist bekannt, dass z.B. β -Karotin und Zeaxanthin (Zx) als Protektoren gegen photooxidativen Stress in der Zelle Verwendung finden (Niyogi et al. 1997; Gentile & Blanch 2001).

Die photosynthetische Ansäuerung der Lumens stimuliert die Deepoxidase (Xanthophyll-Zyklus, VAZ-Zyklus) und führt so zur Bildung von Zx aus Violaxanthin (Vx) (Bendixen 1998). Dieser Prozess bewirkt die Abführung überschüssiger Energie in Form von Wärme (Dissipation) (Gentile & Blanch 2001; Huang et al. 2004). Diese überschüssige Energie kann z. B. durch Starklicht (Verhoeven et al. 1997; Ruban et al. 1999) und/oder durch N-Limitierung (Khamis 1990) generiert werden.

Aufgrund der unveränderten Violaxanthin- (Abb. 3.1.12. A; Abb. 3.2.7. B; Abb. 3.3.6. B) und Zeaxanthinkonzentrationen (Abb. 3.1.15. A; Abb. 3.2.7. B) in den Referenzkulturen kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen von *N. salina* in den Kulturexperimenten PAR-Intensitäten ausgesetzt wurden, die nicht zu einer erhöhten Aktivierung des Xanthophyllzyklus in Richtung Zeaxanthin-Synthese führt.

Das bedeutet, dass für weitere Betrachtungen Licht als Stressor und damit als Stimulus für den Xanthophyllzyklus in den Zellen von *N. salina* als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, die zur Deepoxidierung von Violaxanthin führen kann, besteht in der Nitratlimitierung. Diese wird von Khamis et al. (1990) in Maispflanzen beschrieben, in denen eine Nitratlimitierung zur Bildung von Zeaxanthin und damit zu einer verstärkten Energielöschung („quenchen“) führt. Aber die abnehmenden Konzentrationsverläufe von Violaxanthin (Abb. 3.1.12. A; Abb. 3.2.7. B; Abb. 3.3.6. B) und Zeaxanthin (Abb. 3.1.15. A; Abb. 3.2.7. B) deuten darauf hin, dass in *N. salina* der Xanthophyll-Zyklus in Richtung einer gesteigerten Zx-Synthese nicht durch Änderung der Stickstoffverfügbarkeit induzierbar ist.

In einer Reihe von Arbeiten wird beschrieben, dass β -Karotin unter N-limitierten Bedingungen verstärkt im Zellmetabolismus verschiedener phototropher Mikroorganismen synthetisiert wird (Berges et al. 1996; Geider et al. 1998; Lippemeier 2001) und durch seine photoprotektiven Eigenschaften die Zelle vor Lichtstress schützt (Larkum & Barrett 1983; Edge et al. 1997).

Die Abnahme von β -Karotin unter N-limitierten Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit (Abb. 3.1.14.) könnte darauf hinweisen, dass die photoprotektiven Eigenschaften dieses Pigments unter den vorherrschenden Kultivierungsbedingungen in der Zelle nicht benötigt werden. Das könnte daran liegen, dass kein nitratinduzierter photooxidativer Stress vorgelegen hat, der die Synthese von β -Karotin anregt.

Sollte dennoch eine nitratinduzierte photooxidative Stresssituation in den Zellen vorliegen, wird dieser vermutlich nicht über Zx und/oder β -Karotin entgegengewirkt, sondern der Zellschutz könnte von alternativen Metaboliten wie z.B. Fettsäuren (Hu et al. 2008) übernommen werden (siehe Kap. 4.4.).

Es bleibt dennoch die Frage, warum die Pigmente Vx, Vaux, Zx und β -Karotin (Abb. 3.1.12. – 3.1.15.; Abb. 3.2.7. B – E; Abb. 3.3.6. B, C) bei einer Nitratlimitierung abnehmen. Es ist anzunehmen, dass die Mikroalge *N. salina* in einer nitratlimitierten Situation zugunsten einer gesteigerten Synthese von Triacylglycerol (TAG) (Sukenic et al. 1993a) und zugunsten einer

erhöhten Syntheserate für nitratassimilierende Enzyme (Hipkin et al. 1983) die Synthese von allen hier behandelten Karotenoiden stark minimiert.

Demnach verfolgen die Zellen vermutlich die Strategie, Speicherstoffe wie z.B. TAG als Kohlenstoff- und Energiespeicher aufzubauen, während sie gleichzeitig die Synthese von Schutzpigmenten reduziert.

Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass die photochemisch generierte Energie in Form von NADP(H) und ATP unter N-limitierten Bedingungen nicht nur in die Nitratassimilation, sondern auch in eben diese Speicherstoffe (TAG), die somit als Elektronensenke dienen, investiert wird. Durch diese Elektronenübernahme kann die Funktionsfähigkeit der ETC aufrechterhalten werden (siehe *Kap. 4.4.*). Demzufolge könnte die fehlende Notwendigkeit, Protektoren gegen photooxidativen Stress zu synthetisieren, der Grund für die ausbleibende Zunahme an Zx und β -Karotin in ihrer Funktion als Antioxidantien sein.

4.3.3. Pigmente und Fluoreszenzsignale bei Phosphatmangel

Es ist bekannt, dass Phosphatlimitierungen in *N. gaditana* zu Pigmentänderungen führen (Forján et al. 2007). Dies kann bei *N. salina* unter den hier im turbidostatischen Betrieb durchgeführten Phosphatexperimenten nicht bestätigt werden. Die Konzentrationsverläufe aller Pigmente bei verschiedenen Phosphatangeboten weisen am Prozessende keine signifikanten Unterschiede zu den Messwerten aus der Referenzkultur auf (*Abb. 3.1.11. B – 3.1.15. B*).

Anhand der Fluoreszenzsignale F und F_M' (*Abb. 3.1.2. B, 3.1.3. B; Abb. 3.1.6. B, 3.1.7. B*) kann aber ein Einfluss geringerer Phosphatverfügbarkeit (unterhalb 50 $\mu\text{mol P}$) auf die Photosynthese gegenüber der Referenz (*Abb. 3.1.1., 3.1.5.*) festgestellt werden.

Auffällig dabei ist, dass parallel zu den Fluoreszenzsignalen die Wachstumsrate abfällt (*Abb. 3.1.10. B*). Dieses Absinken der Wachstumsrate ist vermutlich auf die abnehmende Aktivität des Calvin-Zyklus zurückzuführen (Lippemeier et al. 2001), da aufgrund limitierter Phosphatverfügbarkeit weniger Energie in Form von ATP zur Verfügung steht.

Um diesem Problem entgegenzuwirken, könnte die Zelle verstärkt den zyklischen Elektronentransport von PSI betreiben. Dieser Elektronentransport dient dazu, Elektronen von PSI über den Cyt- b_6/f -Komplex wieder in die ETC zurückzuführen und somit die Lichtenergie zur vermehrten ATP-Synthese zu nutzen (Heldt, 1996).

Als Folge dieses zyklischen Elektronentransports könnte es zu einer gesteigerten Oxidation des Plastochinon-Pools kommen und damit zu einem Absinken des Fluoreszenzsignals F . Eine weitere Möglichkeit für das Absinken von F und F_M' unter Phosphatlimitierung könnte in der Umverteilung der beweglichen LHC's vom PSII zum PSI gesehen werden. Diese so genannte „state-transition“ wurde bereits für andere Situationen, wie z.B. Lichtstress beschrieben (Dau & Hansen 1988). Die gesunkenen Fluoreszenzsignale F und F_M' könnten dadurch erklärbar sein, dass weniger Photonen absorbiert und zum PSII geleitet werden. Ferner erreicht die Zelle mit der Umverteilung eine bessere photochemische Ausnutzung der Anregungsenergie und kann so die ETC vor photooxidativem Stress schützen. Darüber hinaus kann somit das PSI verstärkt zur ATP-Synthese beitragen, wenn eine Phosphatlimitierung vorliegt (Wollman 2001).

Obwohl F und F_M' der Referenzkultur (Abb. 3.1.1.) konstant bleiben und F und F_M' der phosphatlimitierten Kulturen (Abb. 3.1.2. B; 3.1.3. B) in parallelen Verläufen sinken, bleibt die nach Gleichung 2.1. berechnete photochemische Effizienz ϕ_{PSII} (Abb. 3.1.1.; 3.1.4. B) von einer Phosphatlimitierung unbeeinflusst.

Der fehlende Einfluss von Phosphat auf die photochemische Effizienz („maximum variable fluorescence yield“; F_V/F_M) wird auch für *Dunaliella tertiolecta* beschrieben, denn auch hier gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen phosphatlimitierten und nicht-phosphatlimitierten Zellen (Berden-Zrimec et al. 2008).

Diese Resultate erscheinen aufgrund der Schlüsselfunktion von Phosphat in der Zelle z.B. für die Bildung energiereicher Phosphatverbindungen (ATP, Phosphatzucker) und für die intrazelluläre Signalgebung (Phosphorylierung, Dephosphorylierung) (Geider et al. 1998) unerwartet. Das Ausbleiben eines durch Phosphatmangel hervorgerufenen Effektes auf die Pigmente und der photochemischen Effizienz ϕ_{PSII} , könnte durch die Induktion eines einzigartigen Phosphor-Stressproteins Erklärung finden (Graziano et al. 1996). Dieses „Stressprotein“ wird nur bei Phosphatlimitierung synthetisiert und steigt mit abnehmender Phosphatverfügbarkeit an. In den internen Membranen vorkommend, wird für dieses Protein angenommen, dass es mit der Mobilisierung von gespeicherten Polyphosphaten zu tun haben könnte (Graziano et al. 1996), die bei Phosphatmangel verfügbar gemacht werden, um abnehmenden Wachstumsraten entgegenzuwirken (Rhee 1973; Graziano et al. 1996). Dieses Protein könnte eine Polyphosphat-Synthetase (Grillo & Gibson 1979) sein, die unter Phosphatmangel induziert wird, solange die Zellen noch wachsen. Für den Nachweis dieses Enzyms in *N. salina* wären weitere Untersuchungen notwendig.

4.3.4. Pigmente und Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Temperaturen

In einer Vielzahl von Arbeiten wird der Temperatureinfluss als Stimulus auf die Pigmentzusammensetzung verschiedener phototropher Organismen beschrieben (Sukenik et al. 1993b; Gentile & Blanch 2001). Dieses Verhalten zeigt sich auch in den Ergebnissen mit *N. salina* (z.B. Abb. 3.5.11.).

Die höchste Chl_a-Konzentration produziert diese Mikroalge im Turbidostaten bei 26 °C, unterhalb und oberhalb dieser Temperatur fallen die Chl_a Konzentrationen deutlich in den Referenzkulturen ab (Abb. 3.5.11.). Dieses Ergebnis wird von Sukenik et al. (1993a) und Gentile & Blanch (2001), die ebenfalls unter turbidostatischen Prozessbedingungen Chl_a-Änderungen von *Nannochloropsis* sp. und *N. gaditana* untersucht haben, bestätigt. Für geringe Chl_a-Konzentrationen in den Kulturen bei niedriger Temperatur (17 °C) könnten die sinkende Nitrataufnahme (Abb. 3.5.3. A) sowie eine abnehmende Enzymaktivität verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit könnte in der Zunahme der PUFA's (Abb. 3.5.6.) liegen, die auf Kosten der Chl_a-Synthese zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität und -integrität bei sinkenden Temperaturen synthetisiert werden. Dieser Aspekt wird in Kap. 4.4. näher diskutiert.

Analog zu den Chl_a-Konzentrationen sinken F (Abb. 3.5.15. A, B) und F_M' (siehe z.B. Abb. 3.2.3., 3.3.2.) mit abnehmender Temperatur, während ϕ_{PSII} über den gesamten Temperaturbereich konstant bleibt (Abb. 3.5.15. C, D). Diese ebenfalls bei den Nitratexperimenten festgestellte Beobachtung (Kap. 4.3.1.) könnte auch hier durch die Chl_a-Verteilung (14 % des Gesamtchlorophylls in den Reaktionszentren, restliches Chlorophyll in LHC (Brown et al. 1987)) in der Zelle erklärt werden. Der geringere Chl_a-Gesamtgehalt in der Zelle könnte dafür verantwortlich sein, dass weniger Lichtenergie vom LHCII absorbiert werden kann und dadurch der Energietransfer vom LHCII zu den Reaktionszentren von PSII abnimmt. Dies führt dann zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3.5.15. A, B), während nachgeschaltete Prozesse hinter PSII (z.B. ETC, PSI, Elektronenakzeptoren hinter PSI) aufgrund der ϕ_{PSII} -Berechnungen hinsichtlich der Elektronentransports keine hier sichtbare erhöhte Sensitivität gegenüber variierenden Kultivierungstemperaturen zeigen.

Abweichend hingegen verhalten sich die Karotenoidkonzentrationen der drei hier betrachteten *Nannochloropsis*-Spezies (Sukenik et al. 1993b; Gentile & Blanch 2001); diese Arbeit) bei ähnlichen Temperaturen. Während z.B. die Vx-Konzentration in *N. salina* mit steigender

Temperatur abnimmt (*Tab. 3.1.5.; 3.2.5.; 3.3.3.*), steigt diese in den beiden o.g. Spezies (Sukenik et al. 1993b; Gentile & Blanch 2001). Eine mögliche Erklärung könnte ein erhöhtes Licht/ Zelle-Verhältnis in den Kulturen von Sukenik et al. (1993b) und Gentile & Blanch (2001) sein, da beide unterschiedliche Zelldichten und PAR-Intensitäten im Vergleich zu den hier durchgeführten Temperaturexperimenten aufweisen. So liegt z.B. die PAR-Intensität bei Gentile & Blanch (2001) mehr als dreimal so hoch, während die Zelldichte bei Sukenik et al. (1993b) bei einer PAR-Intensität von $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 4 geringer ist als die Zelldichte in dieser Arbeit (*Tab. 3.1.3., 3.2.3.*).

Werden die Parameter Phosphat- und Nitratlimitierung mit dem Parameter Temperatur kombiniert, zeigt die Phosphatlimitierung im Vergleich zur Referenzkultur (*Abb. 3.2.7. B – E*) lediglich einen geringen Effekt auf die Chl_*a*- (*Abb. 3.5.11.*) und Karotenoidkonzentrationen bei 17 °C (*Abb. 3.2.7. B – E*), während in stickstofflimitierten Zellen der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Chl_*a*- (*Abb. 3.5.11.*) und Karotenoidkonzentrationen (*Abb. 3.2.7. B – E; 3.3.6. B, C*) ausbleibt. Daraus schlussfolgernd stellt die Nitratlimitierung vor der Phosphatlimitierung und der Temperatur den dominierenden Parameter für die Pigmentkonzentrationen da.

4.4. Fettsäuren

Die Effekte von Temperatur, Nitrat- und Phosphatmangel auf Fettsäuregehalt und -zusammensetzung wurde unter turbidostatischen Bedingungen in *N. salina* untersucht und werden im Folgenden näher diskutiert.

4.4.1. Einfluss von Nitrat auf den zellulären Gesamtfettsäuregehalt (TFA)

Die Anpassung der Zelle an unterschiedliche Stickstoffangebote führt neben Änderungen in der Wachstumsrate (*Kap. 4.2.*) und der Pigmente sowie den Fluoreszenzsignalen F und F_M' (*Kap. 4.3.*) auch zu Änderungen in der Fettsäuresynthese. Diese ist eng verbunden mit der photosynthetischen Aktivität der Zelle, da für die Synthese das erforderliche NADP(H) und ATP durch die Photosynthese bereitgestellt wird.

Wird die Mikroalge *N. salina* nitratlimitierten Bedingungen ausgesetzt, so kommt es zu einer Verschiebung von normaler Fettsäuresynthese, die bei ausgewogenem Nährstoffangebot stattfindet, zu einer stimulierten Fettsäuresynthese und folglich zu einer Akkumulation von

Lipiden in der Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit steigt der zelluläre TFA-Gehalt unter nitratlimitierenden Bedingungen bei 21 °C von 20 % (Abb. 3.5.4.A) auf 55 % (Abb. 3.5.4.B), bei 17 °C steigt dieser Wert noch mal auf über 70 % (Abb. 3.5.4.B) und ist damit nahezu viermal so hoch wie der TFA-Gehalt der Referenzkultur (ohne Nährstofflimitierung) bei 21 °C (Abb. 3.5.4.A).

Der Anstieg der TFA in *Nannochloropsis* bei Stickstoffmangel wird auch von anderen Autoren (Sukenik 1991; Sukenik et al. 1993b; Hu & Gao 2006) nachgewiesen. Es müssen dabei aber voneinander abweichende Kulturführungen sowie Extraktions- und Analysemethoden beachtet werden. Die Verschiebung der TFA-Gehalte bei Stickstoffmangel ist jedoch vergleichbar und zeigt bei allen Autoren eine positive Tendenz.

In einer Arbeit von Hu & Gao. (2006) erreicht *Nannochloropsis* sp. bei 22 °C („batch“) mit 40 % zellulärem TFA den maximalen Gehalt unter nitratlimitierenden Bedingungen und bei einer vollen Nitratversorgung den geringsten TFA-Gehalt mit 11%. Sukenik (1991) gibt den maximal erreichten zellulären Anteil an TFA in einer nitratlimitierten Kultur bei 25 °C („batch“) mit ca. 50 % an. Den geringsten Anteil von zellulärem TFA mit ca. 15 % werden im Vollmedium erzielt. Das entspricht in etwa auch den in dieser Arbeit gemessenen TFA-Werten.

Dem durch eine Nitratlimitierung begünstigten Anstieg der TFA (Abb. 3.5.4. B) liegt die beachtlich gesteigerte Synthese der SAFA (C14:0, C16:0) und MUFA (C16:1, C18:1) zugrunde, welche einen Anteil von bis zu 95 % an den TFA (Tab. 3.1.7. B) haben und überwiegend in Triacylglycerolen (TAG) vorkommen. Generell produzieren Mikroalgen unter dem Stress Nitratmangel wesentlich weniger polare Lipide, dafür aber signifikant mehr neutrale Lipide (TAG) (Tornabene et al. 1983; Ben-Amotz et al. 1985). Letztere gehören zu den so genannten Speicherlipiden, diese liegen demnach als überwiegende Lipidfraktion in *N. salina* bei Nitratlimitierung vor und werden in dicht gepackten Lipidspeichern (Lipidbodies) im Cytoplasma der Zelle gelagert. Generell können Lipidspeicher für die Zellerhaltung schnell konsumiert werden (Suen et al. 1987; Sukenik & Carmeli 1990).

In Abwesenheit von Stickstoff, aber mit ausreichend Licht, fixieren die Zellen weiterhin Kohlenstoff, können aber keine Proteine synthetisieren (Ben-Amotz & Avron 1983). Deshalb wird der Kohlenstoff vorwiegend in die Synthese von stickstoffarmen Komponenten wie Lipide und/ oder Kohlenhydrate eingebunden, welche in der Zelle akkumuliert werden können und so als Kohlenstoffspeicher vorliegen (Sukenik & Carmeli 1990). Dabei ist zu erwähnen, dass Kohlenhydrate bis zu 70 % der BTM erreichen können, ohne die

Biomasseproduktivität zu senken, während die Akkumulation von Lipiden oft mit einer Reduktion der Biomasseproduktivität verbunden ist (Rodolfi et al. 2009).

In einer Stresssituation, wie z.B. bei Stickstoffmangel, akkumulieren sich überschüssige Elektronen in der Elektronentransportkette (ETC) und können eine Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren (Asada 1994; Alscher et al. 1997), welche wiederum die Photosynthese einschränken und Membranlipide, Proteine oder andere Makromoleküle schädigen können (Huner et al. 1996).

Die Bildung einer C18-Fettsäure verbraucht ungefähr 24 NADPH, die über die ETC generiert werden (Hu et al. 2008) - das ist doppelt so viel wie für die Synthese von Kohlenhydraten oder Proteinmolekülen gleicher Masse benötigt wird - und entspannt somit die überreduzierte ETC, welche z.B. als Folge von Nitratmangel entstehen kann. Dies ist u.a. ein Grund dafür, dass TAG's in einigen Mikroalgen als Senke für überschüssige Energie dienen können, die vom Photosyntheseapparat generiert werden (Rabbani et al. 1998; Mendoza et al. 1999; Hu et al. 2008). Vermutlich liegt hierin eine Antwort, wohin die Zelle die aus der Photosynthese gewonnene Energie weiterleiten kann und warum geringer photooxidativer Stress in der Zelle vorherrscht, der sonst durch hohen Reduktionsdruck der ETC oder dem eingeschränkten Elektronen-Akzeptorpool bei N-Mangel (z.B. Nitrat-, Nitritreduktasen, Glutamat-, Calvin-Zyklus) hinter dem PSI besteht. Diese Annahme entsteht aus der Beobachtung, dass keine der hier untersuchten Energiequecher oder Scavenger wie α -Tocopherol (Abb. 3.1.16.), β -Karatoln (Abb. 3.1.14.) oder Zeaxanthin (Abb. 3.1.15.) (VAZ-Zyklus) zunehmende Konzentrationen bei Nitratmangel aufweisen (siehe Kap. 4.3.; 4.5.), gleichwohl aber die Fettsynthese angeregt wird (Abb. 3.5.4. B).

Die TAG-Synthese ist für gewöhnlich mit der sekundären Karotenoid-Synthese in Mikroalgen gleichgeschaltet (Rabbani et al. 1998; Zhekisheva et al. 2002). Die Moleküle (z.B. β -Karatoln, Astaxanthin oder Zeaxanthin), die über den Karotenoid-Syntheseweg produziert werden, werden mit dem TAG verestert und in cytosolischen Lipidkörperchen gelagert. Die peripher verteilten karotenoidreichen Lipidkörper dienen als „Lichtfilter“, um Chloroplasten vor exzessivem Lichteinfluss zu schützen (Hu et al. 2008). In *N. salina* dagegen kann diese Gleichschaltung nicht beobachtet werden, denn im Falle ansteigender SAFA und MUFA (in TAG enthalten; Tab. 3.5.1.) geht die Karotenoid-Synthese (Abb. 3.1.12. A – 3.1.15. A) zurück.

4.4.2. Einfluss von Nitrat auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)

Neutralfette, zu denen u.a. die Triacylglycerole (TAG) gehören, sind Speicherstoffe und können unter bestimmten Umweltbedingungen, wie z.B. unter Nitratmangel, in *Nannochloropsis* akkumuliert werden (Sukenik et al. 1993a, 1993b). Diese Bedingungen haben aber auf Strukturfette wie Glycerolipide (polare Fette), welche mit PUFA's angereichert sind, einen gegenteiligen Effekt. Den größten Anteil an den PUFA's in der Mikroalge *N. salina* beansprucht die Eicosapentaensäure EPA (Tab. 3.1.7.) und folglich kann der Gehalt dieser mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäure durch eine Reihe anderer Bedingungen kontrolliert werden, als jene, die eine Akkumulation von gesättigten (SAFA) oder einfach ungesättigten Fetten (MUFA) bewirken.

Unter unausgewogenen Nährstoffbedingungen, wie z.B. Nitratmangel, haben Algen große Schwierigkeiten, ihren PUFA-Gehalt in den Chloroplasten durch eine Neusynthese zu halten oder zu erhöhen (Solovchenko et al. 2008). In nährstoffreichen Medien dagegen sind Algen in der Lage, eine effizientere Netto-Produktion von Photoassimilaten durchzuführen, besonders die von energiereichen PUFA's (Solovchenko et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit begünstigt, unter turbidostatischer Prozessführung, eine volle Nitratversorgung den Gehalt an EPA in *N. salina*-Kulturen (Abb. 3.5.9. A), während sich eine Nitratlimitierung negativ auf die EPA-Konzentration auswirkt (Abb. 3.5.9. A).

Analoge Tendenzen, jedoch mit diskontinuierlichen „batch“-Kulturen oder chemostatischen Kulturen als Arbeitsgrundlage, werden auch in Arbeiten anderer Autoren mit *Nannochloropsis* präsentiert (Sukenik 1991; Sukenik et al. 1993a; 1993b). Hu & Gao 2006 dagegen veröffentlichten Ergebnisse, in denen *Nannochloropsis* sp. den größten zellulären EPA-Gehalt sowohl bei hohem Nitrat- als auch bei niedrigem Nitratangebot produziert, Kulturen mit mittlerem Nitratangebot aber weit unter diesen Konzentrationen liegen. Allerdings ändert sich bei diskontinuierlichen Prozessen, durch die zunehmende Zellzahl, aufgrund des unkompensierten Zellwachstums, das Licht/Zelle-Verhältnis. Diese Änderungen wirken sich zwangsläufig auf den Zellmetabolismus aus. Im Gegensatz dazu muss hier noch einmal erwähnt werden, dass unter turbidostatischen Prozessbedingungen das Licht/ Zelle-Verhältnis, aufgrund der konstant gehaltenen optischen Dichte, konstant bleibt. So können die hier ermittelten Ergebnisse direkt auf die unterschiedlichen Nitratkonzentrationen zurückgeführt werden.

Generell ist der Vergleich des Fettgehalts in Mikroalgen nur bedingt bzw. tendenziell möglich, da sich unterschiedliche Kultivierungsprozesse und/oder abweichende

Umweltparameter ganz entscheidend auf den zeitlichen Verlauf und auf die quantitative sowie qualitative Produktion von Fetten in der Zelle auswirken.

Die Erhöhung des prozentualen Anteils der PUFA an den TFA (Tab. 3.1.7. B) und dabei insbesondere die Erhöhung des prozentualen Anteils von EPA an den TFA (Abb. 3.5.5.; Tab. 3.1.7. A) sind gerade bei voller Nährstoffversorgung für die Mikroalge *N. salina* aufgrund deren Rolle beim Membranaufbau unerlässlich (Sukenik & Carmeli 1990). Durch den hohen Anteil der PUFA in den Membranlipiden (MGDG, DGDG, DGTS, (Schneider & Roessler 1994; Schneider et al. 1995)) wird mit ihrer Synthese eine entscheidende Plattform für den Photosynthese-Apparat gebildet (Sukenik & Carmeli 1990; Murata et al. 1990; Pick et al. 1987), der wiederum für die, den Aufbau von Photoassimilaten erforderliche Energie in Form von ATP und NADP(H) verantwortlich ist.

4.4.3. Einfluss von Phosphat auf Fettsäuregehalt und -muster

Nach dem Stickstoffangebot ist auch das Phosphatangebot für die Mehrheit der bekannten Mikroalgen für ein optimales Wachstum von größter Bedeutung. Jedoch führen limitierende bzw. gesättigte Phosphatangebote nicht bei allen Algenarten zu gleichen Effekten hinsichtlich der Fettsäureproduktion (Müller-Navarra et al. 2003, Hu & Gao 2006; Krienitz & Wirth 2006).

Die unter turbidostatischen Bedingungen erzielten Ergebnisse von *N. salina* zeigen, dass unterschiedliche Phosphatangebote weder auf den Gesamtfettsäuregehalt (TFA, Abb. 3.5.9. B; 3.5.10.) noch auf die Konzentration der ungesättigten Fettsäuren (EPA, Abb. 3.5.9. B; PUFA, Abb. 3.5.7.) differenzierende Effekte haben. Erst eine suboptimale Wachstumstemperatur von 17 °C wirkt bei gleichzeitigem Phosphatmangel negativ auf die EPA- (Abb. 3.5.10) und PUFA-Konzentration (Abb. 3.5.7). Die temperaturbedingte Herabsetzung der Phosphataufnahme in der Zelle (Abb. 3.5.3., weiteres zu Temperatureinfluss Kap. 4.4.4.) könnte bei gleichzeitig vorliegender Phosphatlimitierung zu einer geringeren Energieverfügbarkeit (ATP, NADP(H)) führen, die für die EPA- bzw. PUFA-Synthese zwingend notwendig ist.

Untersuchungen mit *Nannochloropsis limnetica* (Krienitz & Wirth 2006) dagegen zeigen eine Abnahme sowohl an EPA und PUFA als auch an TFA bei abnehmender Phosphatverfügbarkeit. Weiterhin bemerkenswert scheint in den Ergebnissen von Krienitz & Wirth (2006) die Tatsache, dass durch eine relativ hohe Phosphatzugabe (230 µM; in

vorliegender Arbeit waren es maximal 90 μM), eine Anreicherung von SAFA und MUFA als auch von PUFA in der Zelle stattfindet. Beim Betrachten dieser Werte sind jedoch besonders die Kultivierungsbedingungen von *N. limnetica* zu beachten (Krienitz & Wirth 2006). Diese unterscheiden sich wesentlich von den Bedingungen dieser Arbeit, z.B. durch die Anwendung einer nicht belüfteten „batch“-Kultur mit einer hohen Zelldichte, also durch ein über die Zeit nicht konstantes sowie erheblich geringeres Licht/Zelle-Verhältnis. Hier wird wiederholt deutlich, dass zum Herausarbeiten einzelner, die Fettsäuresynthese beeinflussender Faktoren turbidostatische Kultivierungsbedingungen mit definierten Parametern wie z.B. Licht und pH-Wert vorteilhaft sind.

Dass eine erhöhte Phosphatkonzentration nicht bei allen Algenarten die PUFA-Produktion steigert, wird in einer Phytoplankton-Feldanalyse von Müller-Navarra et al. (2003) gezeigt. In dieser Untersuchung sank die Konzentration ω -3-PUFA (Seston-Proben) mit steigenden Phosphatkonzentrationen, was darauf hinweist, dass die unterschiedlichen Spezies einer Phytoplankton Gemeinschaft unterschiedliche Phosphat-Optima für die Produktion von PUFA haben (Krienitz & Wirth 2006). Auch beim Vergleich verschiedener *Nannochloropsis* Spezies sind unterschiedliche Tendenzen hinsichtlich der PUFA-Konzentrationen bei steigenden oder abfallenden Phosphatverfügbarkeiten zu beobachten (Hu & Gao 2006; Krienitz & Wirth 2006; Sukenik 1993b).

4.4.4. Einfluss der Temperatur auf Fettsäuregehalt und -muster

Die Temperatur ist einer der bedeutendsten Faktoren, die einen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung von Mikroalgen haben. Tendenziell gibt es, ausgehend von den optimalen Wachstumstemperaturen, mit sinkender Temperatur zunehmende Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren und abnehmende Konzentrationen gesättigter Fettsäuren (Sato & Murata 1980; Lynch & Thompson 1982; Seto et al. 1984; Thompson et al. 1992; Sukenik et al. 1993a; Zhu et al. 1997; Renaud et al. 2002; Hu & Gao 2006; Hu et al. 2008).

Auch die Kultivierung von *N. salina* bei unterschiedlichen Temperaturen hat im turbidostatischen Betrieb einen Effekt auf das Fettsäuremuster sowie auf den TFA-Gehalt (Abb. 3.5.4. A). Die Ergebnisse aber zeigen, dass es entgegen des allgemeinen Trends (s.o.) bei zunehmenden Temperaturen zu einer klaren Abnahme von SAFA und MUFA (vgl. Tab. 3.5.1. – 3.5.3.) und folglich auch zu einer Abnahme des zellulären TFA-Gehalts (Abb. 3.5.4.)

(Kap. 4.4.1.) kommt. Der EPA- (Abb. 3.5.4.) und PUFA-Gehalt (Abb. 3.5.6.; 3.5.7.) sinkt ebenfalls bei zunehmender Temperatur.

Die Zunahme der TFA-Konzentration könnte als Folge einer, durch niedrige Temperaturen hervorgerufene, eingeschränkten Nitrataufnahme (Abb. 3.5.3. A) induziert werden und demnach zu einer N-Mangel bedingten Chlorosis führen (Sukenik et al. 1993b). Diese ist durch eine Akkumulation von SAFA und MUFA enthaltenden Triacylglycerolen (TAG) in der Zelle gekennzeichnet. Somit können Temperaturabsenkungen vermutlich indirekt über einen Stickstoffmangel zu einer Anreicherung von TAG führen. Die Nitrataufnahme sowie die Reduktion zu Ammonium sind Reaktionen, die sehr viel Energie benötigen. Bis jetzt ist aber noch nicht geklärt, welcher Schritt - die Aufnahme oder die Umwandlung von Nitrat zu Ammonium - sensibler auf die Temperatur reagiert (Sakamoto & Bryant 1998).

Werden niedrige Temperaturen in Kombination mit einer Nitratlimitierung eingesetzt, produziert die Mikroalge *N. salina* einen maximalen TFA-Gehalt von 70 % (Abb. 3.5.4. B). Dieser ist damit beinahe doppelt so hoch wie der TFA-Gehalt der Referenzkultur (Abb. 3.5.4. A) bei gleicher Temperatur. Damit stellt sich heraus, dass der entscheidende Parameter für die TFA-Synthese die Nitratlimitierung und nicht die Temperatur ist.

Bezüglich der EPA- bzw. PUFA-Synthese in den Referenzkulturen (Abb. 3.5.4. A; Abb. 3.5.6.) wird deren Produktion von Temperaturen begünstigt, die unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur liegen. Folglich kann die Zunahme von PUFA in den Membranlipiden als eine Anpassungsreaktion zur Kompensation für die abnehmende Funktionalität (Membranfluidität) der biologischen Membranen bei niedrigeren Temperaturen betrachtet werden (Ono & Murata 1982; Murata et al. 1984; Wada & Murata 1990; Sakamoto et al. 1997). So verstärkt z.B. eine Zunahme von PUFA in den Glycerolipiden (z.B. MGDG, Monogalactosyldiacylglycerol) der Thylakoidmembranen die Toleranz des Photosynthese-Apparates gegenüber Abkühlungsstress (Wada et al. 1994), wobei zu erwähnen ist, dass das PSII von allen Komponenten des Photosyntheseapparates am meisten thermosensitiv ist (Quinn & Williams 1985; Yordanov et al. 1986). Die Beteiligung von ungesättigten Fettsäuren in Bezug auf die Toleranz bei niedrigen Temperaturen ist aber insofern noch unklar, da die Anpassung an niedrige Temperaturen nicht nur die Entsättigung („desaturation“) von Fettsäuren, sondern auch eine Reihe anderer metabolischer Prozesse der Zelle betrifft (Wada et al. 1994), wie z.B. die Proteinsynthese (Mohapatra et al. 1987), den Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteine oder die Rolle von kalziumabhängigen Proteinkinasen (Monroy et al. 1993).

Der Effekt der Temperatur auf die Zusammensetzung der Fettsäuren und auf den Lipidgehalt scheint sehr komplex zu sein. Der vielschichtige Anspruch der Temperatur an die Zelle ist vermutlich einer der Gründe, warum in der Literatur oft widersprüchliche Angaben zum Einfluss der Temperatur auf *Nannochloropsis* (Boussiba et al. 1987; Sukenik et al. 1993b; Seto et al. 1984; Teshima et al. 1991; James et al. 1989; Hu & Gao 2006) sowie generell auf Mikroalgen gemacht werden (Aaronson 1973; Renaud et al. 1995; Durmaz et al. 2007; Griffiths & Harrison 2009).

Zum Beispiel beschreibt Boussiba et al. (1987), dass sich niedrige Temperaturen negativ auf die TFA-Konzentration von *Nannochloropsis* sp. auswirken können, während Sukenik et al. (1993a) und diese Arbeit von *Nannochloropsis* sp. bzw. *N. salina* zeigen, dass bei niedrigen Temperaturen maximale TFA- und EPA-Konzentrationen als Ergebnis vorliegen können. Konträr dazu stellt Hu & Gao (2006) erhöhte TFA- und EPA-Konzentrationen in *Nannochloropsis* sp. sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Temperaturen fest.

Vielgestaltige Reaktionen des Fettstoffwechsels auf unterschiedliche Temperaturen anderer Mikroalgen werden durch sinkende TFA-Gehalte bei sinkenden Temperaturen in *Ochromonas danica* (Aaronson 1973) und *Porphyridium cruentum* (Durmaz et al. 2007), durch steigende TFA-Gehalte bei sinkenden Temperaturen in *Nitzschia paleacea* (Renaud et al. 1995) beschrieben oder es wird gezeigt, dass sich keine signifikanten Änderungen bei verschiedenen Temperaturen im TFA-Gehalt von *Chlorella sorokiniana* (Patterson 1970) einstellen.

Eine Übereinstimmung lässt sich aber in allen untersuchten Mikroalgen finden: keine Mikroalge erhöht unter optimalen Wachstumstemperaturen TFA oder PUFA-Konzentrationen. Erst suboptimale Wachstumstemperaturen führen zu einer Konzentrationszunahme an TFA und/ oder PUFA.

Es wurde gezeigt, dass selbst Experimente mit nur einer Spezies (z.B. *Nannochloropsis*) unter putativ gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur) voneinander abweichende Ergebnisse hervorrufen (Boussiba et al. 1987; Sukenik et al. 1993b; Hu & Gao 2006). Dies macht deutlich, dass Differenzen in der Fettsäurezusammensetzung, wie auch des TFA-Gehalts, als eine Funktion der Temperatur, aufgrund der widersprüchlichen Anforderungen von Temperaturänderungen auf die Zellphysiologie, sehr komplex sind (Thompson et al. 1992) bzw. die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren und Lipidklassen vom Gleichgewicht, zwischen der Anforderung, entweder Speicherlipide oder Strukturlipide zu synthetisieren, abhängig ist.

Weiterhin liegen unterschiedliche Ergebnisse in der Fettsäuresynthese unterschiedlicher Kulturführungen (z.B. Photobioreaktor-Typ, kontinuierliche oder diskontinuierliche Prozesse) zugrunde. Eine spezifische Aussage über den Effekt eines Umweltparameters, wie der Temperatur, kann nur gemacht werden, wenn andere Faktoren (z.B. Licht/ Zelle-Verhältnis, pH-Wert, Nährstoffe) immer gleich bleiben und kontinuierlich Einfluss nehmen. Dieses Kriterium wird mit dem Einsatz eines turbidostatisch geführten Photobioreaktors erfüllt und ist die Grundlage für alle im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse.

4.5. α -Tocopherol

In der Mikroalge *N. salina* tritt von allen in der Natur vorkommenden Tocochromanolen ausschließlich α -Tocopherol in nachweisbaren Konzentrationen auf (Brown et al. 1999).

Tocopherol übernimmt in der Zelle wichtige antioxidative als auch nicht-antioxidative Funktionen (Fryer 1992; Munné-Bosch & Alegre 2002; Donato et al. 2003; Maeda et al 2006; Durmaz et al. 2007). Eine wichtige Aufgabe des α -Tocopherols ist u.a., die unvermeidlich als Nebenprodukte der Photosynthese entstehenden ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies) zu neutralisieren (Kruk et al. 2005) sowie verschiedene Radikale, wie z.B. Lipidperoxidradikale, abzufangen („scavengen“), um so die Lipidperoxidation-Kettenreaktion zu beenden (Liebler & Burr; Bramley et al. 2000; Schneider 2005).

Es ist bekannt, dass Nitratmangel zu photooxidativem Stress führen kann und dadurch ROS entstehen können (Khamis et al. 1990; Berges et al. 1996; Geider et al. 1998; siehe auch Kap. 4.3.). Zum Beispiel tritt beim Abbau des photosynthetischen Apparates (sinkende Chl_a-Konzentrationen, Abbau von D1/ D2-Proteinen) oxidativer Stress auf (Thompson et al. 1987), welcher z.B. auf das Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen ist. Aber es besteht keine Korrelation zwischen dem Gehalt an α -Tocopherol (Abb. 3.1.16.) und dem Gehalt an Chl_a (Abb. 3.1.11.). Kusmic et al. (1999) fand Hinweise darauf, dass in einer durch fehlende Chloroplasten photosynthetisch inaktiven Mutante von *Euglena gracilis* die Bildung von α -Tocopherol innerhalb der Mitochondrien und unabhängig vom Chl_a-Gehalt stattfindet. Dieser Nachweis zeigt, dass die Bildung von α -Tocopherol nicht direkt mit der Photosynthese assoziiert sein muss.

Es konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass der α -Tocopherolgehalt in *N. salina* bei steigender Lichtverfügbarkeit, nach dem Überführen in die Reaktoren, unabhängig von der N- oder P-Verfügbarkeit (Kap. 4.1.) bis t = 120 h stark absinkt. Demnach scheint das

einstrahlende PAR-Licht und auch zunächst das Nährstoffangebot keinen Einfluss auf den Tocopherolgehalt zu haben. Die Umstellung auf höhere Lichtintensitäten führt dagegen in anderen phototrophen Organismen zu einem Anstieg des Tocopherolgehaltes, um den durch das PAR-Licht generierten ROS entgegenzuwirken (Fryer 1992; Kusmic et al 1999; Trebst et al. 2002; Grasses et al. 2001; Havaux et al. 2005). Die in dieser Arbeit gewählten Kultivierungsbedingungen scheinen in *N. salina* keinen photooxidativen Stress hervorzurufen. Diese Vermutung wurde bereits im vorhergehenden *Kap. 4.3.* in der Diskussion der Pigmente aufgestellt.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Tocopherolkonzentration in den Zellen von *N. salina* abnimmt (*Abb. 3.1.16.*; *Abb. 3.2.8.*), wird in Wang & Quinn (1999) diskutiert. Hier wird vermutet, dass die Einlagerung von Tocopherolmolekülen durch die Kapazität der Plastidenmembransysteme limitiert ist. Diese Vermutung träfe jedoch nur auf die nitratlimitierten Zellen zu, weil jene aufgrund abnehmender Chl_*a*- (*Abb. 3.1.11.*; *Abb. 3.2.7.*) und PUFA-Konzentrationen (*Abb. 3.5.6.*) Veränderungen in der Organisation der Thylakoidmembranen erwarten lassen. Es zeigt sich aber, dass in den Referenzkulturen (*Abb. 3.1.16.*; *Abb. 3.2.8.*) als auch in den Kulturen mit variierenden Phosphatangeboten (*Abb. 3.1.16.B*) und unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen ebenfalls die gleichen abnehmenden Verläufe von α -Tocopherol wie in den nitratlimitierten Kulturen (*Abb. 3.1.16.*; *Abb. 3.2.8.*) erkennbar sind. Beim Betrachten des zeitlichen Verlaufs der α -Tocopherolkonzentrationen (*Abb. 3.1.16.*; *Abb. 3.2.8.*) und den im Vergleich zu den Startwerten geringen Unterschieden zwischen den Kulturen unterschiedlicher Nährstoffverfügbarkeit am Prozessende wird der Einfluss durch die Kapazität der Plastidenmembransysteme als entscheidender Parameter für die Tocopherolgehalte ausgeschlossen.

Ergänzend zu den o.g. Einflussgrößen wie ROS und Membrankapazitäten, sei noch ein weiterer Faktor erwähnt. Ogbonna et al. (2002) nimmt an, dass die Konzentration an zugeführtem CO₂ den Tocopherolgehalt in photosynthetischen Organismen verändern kann. Danach resultiert aus einer geringen CO₂-Versorgung ein ansteigender Tocopherolgehalt. Da die Vorkulturen wie auch die Reaktorkulturen mit einem CO₂-Luftgemisch versorgt wurden, besteht aufgrund der hohen α -Tocopherolwerte zu Beginn des Prozesses (*Abb. 3.1.16.*; *Abb. 3.2.8.*) die Möglichkeit, dass die Verfügbarkeit von CO₂ pro Zelle in den Vorkulturen niedriger gewesen sein könnte als in den Reaktoren. Um diese Theorie zu verifizieren, wären aber Kulturführungen mit Gasbilanzierungen nötig.

Nach allen bisherigen Betrachtungen wird für diese Arbeit primär die Alterung der Zelle als Ursache für eine gesteigerte α -Tocopherolsynthese angenommen. Zunehmende α -Tocopherolkonzentrationen während der Wachstumsphasen („life cycle“) hängen vermutlich mit dem erhöhten Bedarf an Antioxidantien während des Alterungsprozesses der Mikroalgen zusammen (Donato et al. 2003). Dementsprechend ist der Tocopherolgehalt einiger Mikroalgen in den exponentiellen Wachstumsphasen niedriger als in den stationären Phasen oder „decay“-Phasen (Brown et al. 1999; Donato et al. 2003; Durmaz et al. 2007). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen erheblich mehr α -Tocopherol bei „Alterungsstress“ als bei photooxidativem Stress synthetisieren (Donato et al. 2003). In einem turbidostatischen Prozess wird dem Alterungsprozess der Zellen jedoch entgegengewirkt und demnach kann es zwischen der Wachstumsrate und der α -Tocopherolkonzentration keine Korrelation geben. Auch wenn die Wachstumsrate im Reaktor absinkt bzw. solange eine Wachstumsrate vorhanden ist, gibt es die Zufuhr von frischem Medium aus den Reservoiren bei gleichzeitigem Ablauf von Zellen in den Überlauf. Aus diesem Grund können keine seneszenten/ alternden Zellen im Reaktor akkumulieren und damit den Tocopherolgehalt ansteigen lassen.

Die zeitlichen Verläufe von α -Tocopherol aller Kulturen weisen untereinander einen ähnlichen Verlauf auf (z.B. *Abb. 3.1.16*). Insgesamt liegt jedoch der Konzentrationsbereich für α -Tocopherol am Ende der turbidostatischen Prozesse der nitratlimitierten Kulturen ($340 - 550 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ (*Abb. 3.1.16.A*)) und der phosphatlimitierten Kulturen ($230 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ bis $150 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ (*Abb. 3.1.16. B*)) deutlich niedriger als zu Beginn des Prozesses ($1200 - 1600 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$) (*Abb. 3.1.16. A*). Die Differenz der Tocopherolkonzentrationen von $150 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ bis $340 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ innerhalb der Nitrat- und Phosphatexperimente sind vermutlich auf biologische Schwankungen in der Mikroalge *N. salina* zurückzuführen und werden daher nicht weiter diskutiert.

Beim Vergleich der Endkonzentrationen von α -Tocopherol (*Abb. 3.5.13.; 3.5.14.*) aller Prozesse unterscheidet sich lediglich die nitratlimitierte Kultur N_{75} von den anderen Kulturen durch erhöhte α -Tocopherolkonzentrationen (*Abb. 3.5.14. A*). Diese lag mit $550 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ höher als die der Referenzkultur ($320 \mu\text{g [g BTM]}^{-1}$).

Die bei einer Nitratlimitierung deutlich hervortretenden geringeren Wachstumsraten (*Abb. 3.5.1.*) sorgen für eine geringere Austauschgeschwindigkeit und somit zu einer größeren Verweilzeit der nitratlimitierten Zellen im turbidostatisch betriebenen Reaktor. Dies führt zu durchschnittlich älteren Zellen, als sie vergleichsweise in der Referenzkultur und in den

Phosphatkulturen (Abb. 3.5.1.) vorliegen. Der bereits oben erwähnte Faktor Seneszenz ist vermutlich auch hier der Grund für die erhöhten α -Tocopherolkonzentrationen in den nitratlimitierten Kulturen.

Ein Einfluss der Temperatur auf die Tocopherolsynthese (Abb. 3.5.13.) ist in der Referenzkultur und in der nitratlimitierten Kultur nicht zu beobachten. Vermutlich gibt es auch keinen Einfluss der Temperatur in phosphatlimitierten Kulturen auf die Produktion von α -Tocopherol. Dafür spricht die Konzentration an α -Tocopherol in der phosphatlimitierten Kultur bei 17 °C, welche vergleichbar mit den Werten der Referenzkulturen bei 17 °C und 21 °C sind. Die niedrige α -Tocopherolkonzentration von 150 $\mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ in der phosphatlimitierten Kultur bei 21 °C könnte auf Abweichungen in der Lagerung und/oder in der Aufarbeitung des Probenmaterials liegen. Aufgrund dieser Möglichkeit könnte der ermittelte Tocopherolwert der phosphatlimitierten Kultur bei 21 °C von den tatsächlichen Werten nach unten abweichen.

Zusammengefasst kann man die α -Tocopherolergebnisse von *N. salina* wie folgt darstellen: Die Konzentrationen an α -Tocopherol, die zum Prozessende in allen Zellen vorliegt, reichen vermutlich aus, um die entstehenden ROS zu neutralisieren.

Der dominierende Parameter für eine gesteigerte α -Tocopherolsynthese liegt vermutlich im Alterungsprozess der Zellen von *N. salina*. Aus den Ergebnissen der turbidostatischen Prozesse ist zu ersehen, dass die Parameter Nährstoffe und Temperatur wohl nur einen untergeordneten Einfluss auf die Tocopherolsynthese ausüben.

Für eine gesteigerte α -Tocopherolbildung ist die Kultivierung der Mikroalge *N. salina* in einer diskontinuierlichen „batch“-Kultur mit hohen Zelldichten am besten geeignet. Hohe α -Tocopherolkonzentrationen von bis zu 5200 $\mu\text{g [g BTM]}^{-1}$ in vier bis sechs Wochen alten „batch“-Kulturen (Daten nicht gezeigt) machen *N. salina* zu einem attraktiven Favoriten für die Produktion von α -Tocopherol.

4.6. Produktivitäten und Bioverfahrenstechnische Aspekte

Im folgenden Kapitel wird der Fokus auf die Produktion vom Gesamtfettgehalt (TFA) und der ω 3-Fettsäure EPA gelegt.

In Kap. 4.4. wird dargelegt, dass für die Maximierung zellulärer TFA-Gehalte (Abb. 3.5.4. B) eine andere Kombination von Stickstoff und Temperatur als für die Maximierung von zellulären EPA-Gehalten (Abb. 3.5.4. B) von Bedeutung ist. Für die Steigerung der

Produktivität des Gesamtfettgehaltes (TFA, *Abb. 3.5.18.*) bzw. einzelner Komponenten (EPA, *Abb. 3.5.19.*) jedoch hat die Wachstumsrate einen entscheidenden Einfluss.

Der zelluläre TFA-Gehalt ist in nitratlimitierten und bei niedrigen Wachstumstemperaturen (17 °C, 21 °C; *Abb. 3.5.4. B*) kultivierten Zellen am höchsten. Diese Kultivierungsbedingungen wirken sich jedoch ungünstig auf Wachstumsraten (*Abb. 3.5.1.*) aus und dementsprechend fällt die Produktivität im Vergleich zu anderen Produktionsraten, beispielsweise die der Referenz bei 17 °C und 21 °C, ab (*Abb. 3.5.18.*). Diese Referenzkulturen dagegen haben bedeutend niedrigere zelluläre TFA-Werte (*Abb. 3.5.4. A*), besitzen aber aufgrund ihrer hohen Wachstumsraten größere TFA-Produktivitäten.

Die vielfach essentiell benötigte ω 3-Fettsäure EPA wird wie TFA ebenfalls unter niedrigen Kultivierungstemperaturen (17 °C) in der Zelle angereichert (*Abb. 3.5.4.*), doch ist dafür ein ausgewogenes Nährstoffangebot notwendig. Demnach überrascht es nicht, dass die höchste Produktivität von EPA in der Referenzkultur bei 21 °C (*Abb. 3.5.19.*) erzielt wird. Die zweithöchste EPA-Produktivität erreicht die Referenzkultur bei 26 °C aufgrund der hohen Wachstumsrate (*Abb. 3.5.1.*), obwohl der zelluläre EPA-Gehalt im Vergleich zu 17 °C und 21 °C deutlich geringer ausfällt (*Abb. 3.5.4. A*).

Die hier präsentierten Daten geben einen Hinweis darauf, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Umweltparameter, die den höchsten EPA-Gehalt (*Abb. 3.5.4. A*) bewirken, gleichzeitig für hohe Wachstumsraten (*Abb. 3.5.1.*) verantwortlich sind und dementsprechend auch generell hohe Produktionsraten generieren. Faktoren (Nitratmangel in Kombination mit niedriger Temperatur (*Abb. 3.5.4. B*)), die zur Akkumulation von TFA führen, senken die Wachstumsraten (*Abb. 3.5.1.*) und führen damit im Allgemeinen auch zu geringen Produktionsraten.

Daraus schlussfolgernd unterscheiden sich die Prozessstrategien für die in dieser Arbeit ermittelten Produktionsraten von TFA oder EPA lediglich durch das Kultivieren bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei ausgewogener Nährstoffversorgung ist für die Produktion von TFA eine Temperatur unterhalb von 21 °C und für die Produktion von EPA eine Temperatur zwischen 21 °C und 26 °C einzusetzen.

An dieser Stelle soll noch mal angemerkt sein, dass die hier präsentierten Ergebnisse der Produktivitäten nicht aus optimierten Protokollen resultieren und aufgrund der geringen Biomasse in den Turbidostaten die Produktivitäten teilweise weit unter den Produktivitäten der mittels „batch“-Verfahren erzielten Ergebnisse anderer Veröffentlichungen (Sukenic 1991; Hu & Gao 2006; Griffiths & Harrison 2009; Rodolfi et al. 2009) liegen. Aufgrund der hohen Diversität der Faktoren (kontinuierliche oder diskontinuierliche Kulturführung,

Photobioreaktor-Typ, Vorkulturen, Kultivierungsdauer, Umweltparameter, etc.), die bei der Kultivierung von Mikroalgen im Allgemeinen und *Nannochloropsis* im Speziellen eine Rolle spielen, sind keine direkten Vergleiche der absoluten Produktivitäten sinnvoll, sondern allenfalls grundlegende Tendenzen erkennbar.

5. AUSBLICK

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen unterschiedlicher Umweltbedingungen auf verschiedene physiologische Parameter der Mikroalge *N. salina* unter turbidostatischen Prozessführungen. Die dabei erzielten Ergebnisse zeigen deutlich das Adaptionspotential der Mikroalge.

Allerdings stellen sich weitere Fragen in Bezug auf das zellphysiologische Verhalten. Für die Durchführung weiterer Phosphatexperimente sollte der Schwerpunkt der Analytik auf die Bestimmung des Enzyms Polyphosphat-Synthetase gelegt werden. Dieses scheint eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle bei Phosphatmangel einzunehmen. In welcher Art und Weise dieses Enzym den Zellstoffwechsel bei phosphatlimitierten Kultivierungsbedingungen beeinflusst bzw. an der Bereitstellung von Phosphat beteiligt ist, konnte bisher noch nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Die hier gezeigten α -Tocopherolkonzentrationen deuten an, dass in *N. salina* α -Tocopherol bevorzugt unter diskontinuierlichen Prozessen akkumuliert wird. Um das Akkumulationspotential von α -Tocopherol in *N. salina* zu ermitteln, scheint ein „batch“-Prozess der bevorzugte Ansatz zu sein. Auch hier wäre es interessant, wie Nährstofflimitierungen und Temperaturänderungen dieses Akkumulationspotential in *N. salina* beeinflussen.

Aufgrund der relativ leichten Kultivierbarkeit und der z.B. für die Biogas- und/oder Biodieselgewinnung günstigen Zellzusammensetzung, eignet sich *N. salina* gut für eine biotechnologische Nutzung. Hierbei wäre es sicherlich auch von Interesse, welche Möglichkeiten in einer CO₂-Nutzung bestehen würden. Könnte die Produktion von *N. salina* gekoppelt sein mit einer Abgasnutzung von z.B. Blockheizkraftwerken? Welche CO₂-Konzentrationen sind im zellphysiologisch akzeptablen Bereich für *N. salina*? Welche Gaszusammensetzungen sind als kritisch für die Produktion von *N. salina* anzusehen?

Für diese Fragestellungen sind Vorversuche im Labormaßstab notwendig. Mittels einer angeschlossenen Gasanalytik könnten berechnete Gasbilanzen sowohl von kontinuierlichen als auch diskontinuierlichen Experimenten Erkenntnisse bezüglich einer CO₂-Verwertung liefern.

Natürlich kann diese Arbeit auch als Ansatz dienen für die Untersuchungen weiterer interessanter Mikroalgen und deren Beeinflussung durch variierende Kultivierungsparameter. Als mögliche Kandidaten seien hier nur beispielhaft die Mikroalgen *Isochrysis galbana* und *Pavlova lutheri* zu nennen. Beide haben ähnlich wie *N. salina* ein für die kommerzielle Nutzung interessantes Fettsäureprofil und sind in der Lage, einzelne (DHA in *Isochrysis galbana*) oder mehrere (EPA und DHA in *Pavlova lutheri*) intrazellulär im zweistelligen Prozentgehalt zu akkumulieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Alle Ergebnisse dieser Arbeit stammen aus Kultivierungen der Mikroalge *Nannochloropsis salina* (SAG 40.85) und wurden durch den Einsatz eines turbidostatisch geregelten Photobioreaktors generiert. Diese Art der Kulturführung ermöglicht es, spezifische Effekte einzelner Umweltparameter unter Konstanthaltung anderer beeinflussender Faktoren aufzuklären und stellt einen entscheidenden Vorteil einer kontinuierlichen gegenüber einer diskontinuierlichen Prozessführung dar.

Im Wesentlichen wurde der Einfluss der Parameter Nährstoffverfügbarkeit (Nitrat, Phosphat) und Temperatur sowie eine Kombination aus beiden Parametern mit dem Schwerpunkt auf Fettsäuren sowie auf Wachstumsraten, Pigmente, Fluoreszenzen und α -Tocopherol experimentell ermittelt. Dabei wurden zum einen die zeitlichen Verläufe und zum anderen die Endergebnisse gegenübergestellt.

Hierbei zeigte sich, dass maximale Wachstumsraten und Pigmentkonzentrationen bei *N. salina* im Vollmedium bei einer Temperatur von 26 °C erzielt werden. Ausgehend von diesen optimierten Wachstumsbedingungen übt eine Nitratlimitierung einen stärkeren Einfluss auf die Wachstumsrate und die Pigmentkonzentrationen aus als eine Phosphatlimitierung oder eine Temperaturänderung oberhalb oder unterhalb dieser optimalen Wachstumstemperatur. Die photochemische Effizienz wird dagegen kaum beeinträchtigt, wenn nur ein Umweltparameter (Nitratmangel oder Temperatur) als Stressor wirkt. Erst eine Kombination beider Stressoren wirkt sich negativ auf die photochemische Effizienz aus.

Die in einem turbidostatischen Prozess mit einem relativ hohen Licht/Zelle-Verhältnis generierten α -Tocopherolkonzentrationen zeigen relativ niedrige Werte mit nur marginalen Unterschieden zwischen den Nitrat-, Phosphat- sowie Temperaturexperimenten. Geeignete Voraussetzungen für eine hohe Tocopherolkonzentration in der Zelle wären z.B. ein geringes Licht/Zelle-Verhältnis und stationäre Wachstumsraten bzw. alternde Kulturen.

Für die Fettsäureexperimente mit *N. salina* unter turbidostatischen Bedingungen gilt, dass eine Nitratlimitierung den zellulären TFA-Gehalt und eine volle Nitratversorgung den zellulären EPA-Gehalt begünstigt. Darüber hinaus können diese schon relativ hohen EPA- und TFA-Konzentrationen durch den zusätzlichen Einsatz niedriger Temperaturen gesteigert werden. Die Untersuchungen bei Phosphatmangel jedoch ergeben, dass dieser weder einen negativen noch positiven Einfluss auf die TFA- oder EPA-Konzentration in *N. salina* hat.

Die höchsten Produktivitäten von TFA und EPA werden maßgeblich durch eine ausgewogene Nährstoffversorgung und Temperaturen unterhalb von 21 °C (TFA) bzw. Temperaturen zwischen 21 °C und 26 °C (EPA) erzielt. Aufgrund dieser Produktivitätspotentiale und ihrer physiologischen Eigenschaft, hohe TFA- und EPA-Konzentrationen in der Zelle zu akkumulieren, ist die Mikroalge *N. salina* ein ausgesprochen empfehlenswerter Kandidat für eine Produktion im Großmaßstab.

7. SUMMARY

The results presented in this study were obtained by the cultivation of the microalgae *Nannochloropsis salina* (SAG 40.85) under turbidostatic controlled photobioreactors. This control mode enables the determination of specific effects induced by single environmental parameters, whereas other parameters remain constant. This kind of process control delivers a fundamental advantage compared to discontinuously operating processes.

Mainly, the influence of the nutrient availability (nitrate, phosphate), temperature and the combination of both on the fatty acids and growth rate, pigments, fluorescence and α -tocopherol were experimentally investigated. Both time courses and final results were compared.

The maximal growth rate and pigment concentrations of *N. salina* were obtained at 26 °C and full media concentrations. Based on this optimized growth conditions, nitrate limitation exerts

a stronger influence on growth rate and pigment concentration than phosphate limitation or changes of the temperature below or above this optimal growth temperature.

If one environmental parameter (nitrate starvation or temperature) acts as a stressor, the photochemical efficiency remains nearly constant. Only a combination of both stressors affected negatively the photochemical efficiency.

The low α -tocopherol concentrations in the turbidostatic processes with high light per cell ratios hardly differ between nitrate, phosphate and temperature experiments. Therefore, suitable conditions for a high tocopherol concentration could be, e.g. low light per cell ratios and stationary growth conditions and aging cultures, respectively.

In terms of the fatty acid experiments of *N. salina* under turbidostatic control a nitrate limitation enhances the cellular TFA content, whereas full media concentration favours the cellular EPA content. Furthermore, low temperatures lead to an additional increase of the high EPA and TFA concentrations. In contrast to these findings phosphate limitation neither positively nor negatively effect the TFA and EPA concentration in *N. salina*.

The highest productivities of TFA and EPA are substantially achieved by a balanced supply of nutrients and temperatures below 21 °C (TFA) and temperatures between 21 °C and 26 °C (EPA), respectively. Since both, the production potential and their physiological ability to accumulate high cellular amounts of TFA and EPA, *N. salina* is a promising candidate for a large-scale production.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, S. (1973)** Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate *Ochromonas danica*. J. Phycol. 9, 111–113.
- Abe, K., Nishimura, N. & Hirano, M. (1999)** Simultaneous production of β -carotene, vitamin E and vitamin C by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. J. Appl. Phycol. 11, 331–333.
- Abu-Rezq, T.S., Al-Musallam, L., Al-Shimmari, J. & Peter Dias (1999)** Optimum production conditions for different high-quality marine algae. Hydrobiologia 403, 97–107.
- Adam, O. (1994)** Beeinflussung der Biosynthese der Eicosanoide durch die Ernährung-Klinische Konsequenzen. E. J. Lipid Sci. Tech. 96 (1), 7-12.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. (1997)** Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiol. Plantarum 100, 224-233.
- Amino, S., Fujimura, T. & Komamime, A. (1983)** Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. Physiol. Plant. 59, 393-396.
- Antia, N.J. & Cheng, J.Y. (1982)** The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the *Eustigmatophyceae*. Br. Phycol. J. 17, 39-50.
- Appenroth, K.J. & Lillo, C. (2003)** Nitratreduktase – Schlüsselenzym der Nitrataassimilation Biol. Unserer Zeit 33 (5) 286-293.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Thomas, J.C. (1992)** Isolation and characterization of native pigment-protein complexes from two *Eustigmatophyceae*. J. Phycol. 28, 32-36.
- Asada, K. (1994)** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H. & Mullineaux, P.M., eds, Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, 77-104.
- Backasch, N., Schulz-Friedrich, R. & Appel, J. (2005)** Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, J. Plant Physiol. 162, 758-766.
- Bannwarth, H., Kremer, B.P., Schulz, A. (2007)** Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie. Springer Berlin Heidelberg.
- Barbosa, M.J., Zijffers, J.W., Nisworo, A., Vaes, W., van Schoonhoven, J. & Wijffels, R.H. (2005)** Optimization of Biomass, Vitamins, and Carotenoid Yield on Light Energy in a Flat-Panel Reactor Using the A-Stat Technique. Biotechnol. Bioeng. 89 (2), 233-242.
- Barlow, R.G., Collos, Y., Maestrini, S.Y. & Roy, S. (1990)** Microphytobenthic pigments in a salt marsh pond determined by HPLC and spectrophotometry. Mar. Microb. Food Webs. 4, 117-128.

- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983)** On the factors which determine massive β -carotene accumulatuin in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72, 593-597.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. & Thomas, W.H. (1985)** Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21 (1), 72-81.
- Bendixen, R. (1998)** Meßtechnische Untersuchungen zur stickstoffabhängigen Lichtresistenz des photosynthetischen Apparates. Christian Albrechts Universität zu Kiel, Dissertation.
- Berden-Zrimec, M., Drinovec, L., Molinari, I., Zrimec, A., Umani, S.F. & Monti, M. (2008)** Delayed fluorescence as a measure of nutrient limitation in *Dunaliella tertiolecta*. *J Photoch. Photobio. B* 92, 13–18.
- Berges, J.A., Charlebois, D.O., Mauzerall, D.C. & Falkowski, P.G. (1996)** Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiol.* 110, 689-696.
- Bieleski, R.L. & Ferguson, J.B. (1983)** The physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Laeuchli, A., Bieleski, R.L. (eds.) *Inorganic plant nutrition encyclopedia of plant physiology. New Series 15A*, 422-449, Springer Verlag Berlin.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S. & Warner, R. L. (1992)** Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99, 1294–1301.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y. and Richmond, A. (1987)** Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12, 37–47.
- Bradford, A., Atkinson, J., Fuller, N. & Rand, R.P. (2003)** The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. *J. Lipid Res.* 44, 1940-1945.
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A. & Wagner, K.H. (2000)** Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.* 80, 913–938.
- Britton, G. (1993)** Structure and nomenclature. In: *Carotenoids in Photosynthesis*. A. Young & G. Britton (Hrsg.), Chapman & Hall, London, 1-15.
- Brown B.E., Ambarsari I., Warner M.E., Fitt W.K., Dunne R.P., Gibb S.W. & Cummings D.G. (1999)** Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs* 18, 99-105.
- Brown J.S. (1987)** Functional organization of chlorophyll a and carotenoids in the alga, *Nannochloropsis salina*. *Plant Physiol.* 83, 434-437.
- Caboche, M., & P. Rouze (1990)** Nitrate reductase a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6, 187-192.

- Carballo-Cárdenas, E.C.**, Tuan, P.M., Janssen, M. & Wijffels, R.H. (2003) Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng.* 20, 139-147.
- Caron, D.A.**, Peele, E.R., Lim, E. L. & Dennett M.R. (1999) Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in the surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.*, 44 (2), 259–272.
- Chini-Zittelli, G.**, Lavista, F., Batianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M. & Tredici, M. R. (1999) Production of eicosapentaenoic acid (EPA) by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotechnol.* 70, 299-312.
- Christie, W.W.** (1989) *Gas Chromatography and Lipids*. The Oily Press Bridgwater, Somerset.
- Crawford, N. M. & Forde, B. G.** (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition, p. 1–25. In C. Somerville, E. Meyerowitz (ed.), *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Crawford, N. M.** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859–868.
- Dähler, F. & Saner, H.** (2007) Die Rolle des Rapsöls in der gesunden Ernährung. *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin* 4, 36-41.
- Danova-Alt, R.** (2008) Die Wirkung von xenobiotischem Phosphit auf die Phosphatmangelantwort und den Stoffwechsel von Pflanzen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation.
- Dau, H. & Hansen, U.-P.** (1988) The involvement of spillover changes in State 1-State 2 transitions in intact leaves at low light intensities. *Biochim. Biophys. Acta* 934, 1, 156-159.
- Dau, H. & Hansen, U.-P.** (1990) A study on the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements. *Photosynth. Res.* 25, 269-278.
- Dau, H.** (1994) Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. *J. Photoch. Photobio. B* 26, 3-27.
- Demmig-Adams, B.**, Gilmore, A.M. & Adams III, W.W. (1996) In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10, 403-412.
- Dietrich, A.**, Mayer, J.E. & Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265, 6360-6368.
- Donato, M.**, Vilela, M.H. & Bandarra, N.M. (2003) Fatty acids, sterols, α-Tocopherol and total carotenoids composition of *Diacronema vlkianum*. *J. Food Lipids* 10, 267-276.

- Durmaz, Y. (2007)** Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272, 717–722.
- Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpınar, S. & Oya Işık (2007)** The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol.* 19, 223–227.
- Edge, R., McGarvey, D. & Truscott, T. (1997)** The carotenoids as antioxidants - a review. *J. Photoch. Photobio. B.* 41, 189-200.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. (1997)** *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA: Blackwell Science.
- Fernandez, E. & A. Galvan (2007)** Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* 58, 2279–2287.
- Fernandez, E., & A. Galvan. (2008)** Nitrate Assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryotic Cell* 7 (4), 555–559.
- Fernandez, E., Schnell, R.A. Ranum, L. P. W. Hussey, S. C. Silflow, C. D. & Lefebvre, P. (1989)** Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6449–6453.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J. & Otero, A. (2009)** Enriching Rotifers with “Premium” Microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Mar. Biotechnol.* 11 (5), 585-595.
- Fisher, T., Minnaard, J. & Dubinsky, Z. (1996)** Photoacclimation in the marine alga *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyte*): a kinetic study. *J. Plankton Res.* 18 (10), 1797-1818.
- Flynn, K.J., Davidson, K. & Leftley, J.W. (1993)** Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) under alternating light and dark. *J. App. Phycol.* 5, 465-475.
- Forján, E., Garbayo, I. Casal, C. & Vílchez, C (2007)** Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas (Ed.) 356-364.
- Fryer, M.J. (1992)** The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15, 381-392.
- Galvan, A. & E. Fernandez (2001)** Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 225–233.
- Garcés, R. & Mancha, M. (1993)** One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211, 139–143.

- Geider, R.J.,** MacIntyre, H.L., Graziano, L.M. & McKay, R.M.L. (1998) Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (*Chlorophyceae*) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur. J. Phycol.* 33, 315–332.
- Gentile, M.-P. & Blanch, H.W.** (2001) Physiology and Xanthophyll Cycle Activity of *Nannochloropsis gaditana*. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (1), 1-12.
- Genty, B.,** Briantais, J.M. & Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92.
- Glass, A.D.W. & Siddiqui, M.Y.** (1995) Nitrogen absorption by plant roots. In: Nitrogen Nutrition in Higher Plants. Edited by Srivastava HS, Singh RP. New Dehli: Associate Publishers, 21-56.
- Grasses, T.,** Grimm, B., Korroleva, O. & Jahns, P. (2001) Loss of α -tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* 213, 620-628.
- Graziano, L. M.,** La Roche, J. & Geider, R. J. (1996) Physiological responses to phosphorus limitation in batch and steady state cultures of *Dunaliella tertiolecta* (*Chlorophyta*): a unique stress protein as an indicator of phosphate deficiency. *J. Phycol.* 32, 825–838.
- Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.** (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production *J. Appl. Phycol.* 21 (5), 493-507.
- Grillo, J. F. & Gibson, J.** (1979) Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *J. Bacteriol.* 140, 508–17.
- Guillard, R. & Ryther, J. H.** (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran (“F” medium). *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Gunstone, F.D. & Harwood, J.L.** (2006) Occurrence and characterisation of oils and fats. In *The Lipid Handbook*, 3rd edn (Gunstone, F.D.; Harwood, J.L. & Dijkstra, A.J., eds). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 37–142.
- Guschina, I.A. & Harwood, J.L.** (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160–186.
- Hager, A. & Holocher, K.** (1994) Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192, 581-589.
- Hager, A.** (1975) Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88, 27-44.

Hammond, J.P. & White, P.J. (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* 59, 93-109.

Hansen, H. P. & Koroleff, F. (1999) Determination of nutrients. In: *Methods in Seawater Analysis*, 3rd edition, edited by: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., & Kremling, K., Wiley-VCH, Weinheim, 159–228.

Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P. & Dörmann, P. (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3451-3469.

Heldt, H.-W. (1996) *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Hibberd, D.J. (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym *Xanthophyceae*). *J. Linnean Soc. London, Bot.* 82, 93-119.

Hincha, D. (2008) Effects of α -tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes *FEBS Letters* 582 (25), 3687-3692.

Hipkin, C. R., Thomas, R. J. & Syrett, P.J. (1983) Effects of nitrogen deficiency on nitrate reductase, nitrate assimilation and photosynthesis in unicellular marine algae. *Mar. Biol.* 77, 101-105.

Hoshida, H., Ohira, T. Minematsu, A., Akada, R. & Nishizawa, Y. (2005) Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J. Appl. Phycol.* 17, 29-34.

<http://commons.wikimedia.org>

<http://epsag.uni-goettingen.de>

<http://wdcn.nig.ac.jp/hpcc.html>

<http://www.marine.csiro.au/microalgae>

Hu, H. & Gao, K. (2003) Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 25, 421–425.

Hu, H. & Gao, K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.* 28, 987-992.

- Hu, Q.,** Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008) Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials: Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances *The Plant Journal* 54, 621–639.
- Huang, Z.A.,** Jiang, D.A., Yang, Y., Sun, J.W. & Jin, S.H. (2004) Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42 (3), 357-364.
- Huner, N.P.A.,** Maxwell, D. P., Gray, G. R., Savitch, L. V., Krol, M., Ivanov, A. G. & Falk, S. (1996) Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: redox state of photosystem II. *Physiol. Plant.* 98, 358–364.
- James, C.M. & Abu-Rezq, T.S. (1988)** Effect of different cell density of *Chlorella capsulata* and a marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 69, 43–56.
- James, CM.,** Al-Hinty, S. & Salman, A.E. (1989) Growth and ω 3 fatty acid composition of marine microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77, 337-351.
- Janssen, M.A.K.,** Mattoo, A.K. & Edelman, M. (1999) D1-D2 protein degradation in the chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 260, 527-532.
- Jin, Y.H. & Tao, D.L. (2000)** PS II photoinhibition and O₂ production. *Acta bot. sin.* 42, 10-14.
- Kaiser, W. M.,** Weiner, H. & Huber, S. C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* 105, 385-390.
- KamalEldin, A. & Appelqvist, L.A. (1996)** The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Karandashov, V. & Bucher, M. (2005)** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10, 22-29.
- Karlson, B.,** Potter, D., Kuylentierna, M. & Andersen, R.A. (1996) Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (*Monodopsidaeae, Eustigmatophyceae*), a marine ultraplankter. *Phycologia* 35: 253-260.
- Khamis, S.,** Lamaze, T., Lemoine, Y. & Foyer, C. (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. Relationships between electron transport and carbon assimilation. *Plant Physiol.* 94, 1436-1443.
- Knox, J.P. & Dodge, A.D. (1985)** Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24 (5), 889-896.
- Kolber, Z.,** Zehr, J. & Falkowski, P (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol.* 88, 923-929.

- Korstad, J., A. Neyts, T. Danielsen, I. Overrein & Y. Olsen (1995)** Use of swimming speed and egg ratio as predictors of the status of rotifer cultures in aquaculture. *Hydrobiologia* 313/314, 395–398.
- Krienitz, L. & Wirth, M. (2006)** The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (*Eustigmatophyceae*) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia*, 36, 204-210.
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.-B. & Weiler, W. (2000)** *Nannochloropsis limnetica* (*Eustigmatophyceae*), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39, 219-227.
- Krinsky, N.I. (1979)** Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* 51, 649-660.
- Kruk, J., Holländer, C.H, Oettmeier, W. & Trebst, A. (2005)** Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J. Plant Physiol.* 162, 749-757.
- Kusmic, C., Barsacchi, R., Gualtieri, P. & Passarelli, V. (1999)** *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *J. Appl. Phycol.* 10, 555–559.
- Larkum, A.W.D. & Barrett, J. (1983)** Light-harvesting processes in algae. *Adv. Bot. Res.* 10, 1-219.
- Liebler, D.C. & Burr, J.A. (1992)** Oxidation of vitamin E during ironcatalyzed lipid peroxidation—Evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. *Biochemistry* 31, 8278–8284.
- Liebler, D.C. (1993)** The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 23, 147–169.
- Lillo, C. & Appenroth, K.-J. (2001)** Light regulation of nitrate reductase in higher plants: which photoreceptors are involved? *Plant Biol.* 5, 455-465.
- Lippemeier, S. (2001)** A physiological process monitoring for microalgal biotechnology based on the detection of variable chlorophyll fluorescence. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dissertation.
- Lippemeier, S., Hintze, R., Vanselow, K. H., Hartig, P. & Colijn, F. (2001)** In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects to fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* 36, 89–100.
- Lohr, M. (2000)** Beziehungen zwischen den Xanthophyllzyklen und der Biosynthese von Lichtsammelxanthophyllen in Chlorophyll a/c-haltigen Algen, Johannes-Gutenberg-Universität zu Mainz, Dissertation.

- Lubián, L.M. & Montero, O. (1998)** Excess light-induced Violaxanthin cycle activity in *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae): effects of exposure time and temperature. *Phycologia* 37, 16–23.
- Lubian, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido I., Huertas, I.E., Sobrino, C., Gonzalez-del Valle, M. & Pares, G. (2000)** *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments, *J. Appl. Phycol.* 12, 249–255.
- Lynch, D.V. & Thompson, G.A. (1982)** Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 69, 1369–1375.
- Maeda, H., Song, W., Sage, T.L. & DellaPenna, D. (2006)** Tocopherols Play a Crucial Role in Low-Temperature Adaptation and Phloem Loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18, 2710–2732.
- Mantoura, R. F. C. & Llewellyn, C. A. (1983)** The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reversephase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 151, 297–314.
- Marschner, H. (1995)** Mineral nutrition in higher plants. 2nd edn., Academic Press London.
- Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y. & Naeda, T. (1986)** Identification of the alga known as “marine *chlorella*” as a member of the Eustigmatophyceae. *Jpn. J. Phycol.*, 34, 319-325.
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A. & Hansen, U.-P. (2005)** A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *J. Appl. Phycol.* 17 (6), 535-549.
- Mendoza, H., Martel, A., Jimenez del Rio, M. & Garcia Reina, G. (1999)** Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 11, 15–19.
- Milione, M., Zeng, C. & Tropical Crustacean Aquaculture Research Group (2007)** The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 273 (4), 656-664.
- Mimura, T. (1999)** Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology* 191, 149-200.
- Mohapatra, S.S., Poole, R.J. & Dhindsa, R.S. (1987)** Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of *Alfalfa*. *Plant Physiol.* 84, 1172-1176.
- Monroy, A.F., Sarhan, F. & Dhindsa, R.S. (1993)** Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. Evidence for a role of calcium. *Plant Physiol.* 102, 1227-1235.

- Moreno-Garrido, I.**, Blasco, J., González-Delvalle, M. & Lubián L.M. (1998) Differences in Copper accumulation by the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*, submitted to two different thermal treatments. *Ecotox. Environ. Rest.* 1 (1), 43–47.
- Müller-Navarra, D.C.**, Brett, M.T., Park, S., Chandra, S., Ballantyne, A.P., Zorita, E. & Goldman, C.A. (2003) Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Letters of Nature* 427, 69-72.
- Mullineaux, C.W.**, Ruban, A.V. & Horton, P. (1994) Prompt heat release associated with Δ pH-dependent quenching in spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1185, 119-123.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L.** (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31-57.
- Munné-Bosch, S.** (2005) Linking tocopherols with cellular signaling in plants. *New Phytol.* 166, 363-366.
- Murata, N.**, Fujimura, Y. & Higashi, S. (1990) Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1019, 261-268.
- Murata, N.**, Wada, H. & Hirasawa, R. (1984) Reversible and irreversible inactivation of photosynthesis in relation to the lipid phases of membranes in the blue-green algae (cyanobacteria) *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis*. *Plant Cell Physiol.* 25, 1027–1032.
- Niyogi, K. K.** (1999) Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50,333–59.
- Niyogi, K.K.**, Björkman, O. & Grossman, A.R. (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14162-14167.
- Ogbonna, J.C.**, Ichige, E. & Tanaka, H. (2002) Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 532–538.
- Okamoto, M.**, Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Crawford, N. M. & Glass, A. D. (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol.* 140, 1036–1046.
- Ono, T.A. & Murata, N.** (1982) Chilling susceptibility of the bluegreen alga *Anacystis nidulans*. 3. Lipid phase of cytoplasmic membrane. *Plant Physiol.* 69, 125–129.
- Orsel, M.**, Chopin, F. Leleu, O., Smith, S.J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F. & Miller, A. J. (2006) Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 142, 1304–1317.

- Owens, T.G.,** Gallagher, J.C. & Alberte, R.S. (1987) Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (*Eustigmatophyceae*). *J. Phycol.* 23, 79-85.
- Parsons, T.R.** (1984) Determination of Nitrate. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis (Parsons, T.R., Maita, Y. & Lalli, C.M., editors), 3-7. Pergamon Press, Frankfurt.
- Patterson, G.** (1970) Effect of temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. *Lipids* 5, 597–600.
- Pick, U.,** Weiss, M., Gounaris, K. & Barber, J. (1987) The role of different glycolipids in the function of reconstituted chloroplast ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 891, 28-39.
- Plumley, F.G.,** Douglas, S.E., Switzer, A.B. & Schmidt, G.W. (1989) Nitrogen-dependent biogenesis of chlorophyll-protein complexes. In: W.R. Briggs, ed, *Photosynthesis*. A.R. Liss, New York, 311-329.
- Pulz, O. & Gross, W.** (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Quesada, A.,** Galvan, A. & E. Fernandez (1994) Identification of nitrate transporters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 5,407–419.
- Quinn, P. J. & Williams, W. P.** (1985) Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthetic function. In: *Topics in Photosynthesis*, eds. Barber, J. & Baker, N. R. (Elsevier, Amsterdam), 6, 1-47.
- Rabbani, S.,** Beyer, P., Von Lintig, J., Huguency, P. & Kleinig, H. (1998) Induced β -carotene synthesis driven by tiacylglycerol eposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 116, 1239–1248.
- Rausch, C. & Bucher, M.** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216, 23-37.
- Rawlyer, A. & Siegenthaler, P.A.** (1989) Change in the molecular organization of monogalactosyldiacylglycerol between resting and functioning thylakoid membranes: Involvement of the CF_0/CF_1 -ATP synthetase. *BBA – Bioenergetics* 975 (2), 283-292.
- Renaud, S.M.,** Thinh, L.V., Lambrinidis, G. & Parry, D.L. (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195–214.
- Renaud, S.M.,** Zhou H.C., Parry, D.L., Thinh, L-V & Woo, K.C. (1995) Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *J. Appl. Phycol.* 7, 595–602.

- Rhee, G. Y. (1973)** A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp.. J. Phycol. 9, 495–506.
- Rhiel, E., Krupinska, K. & Wehrmeyer, W. (1986)** Effects of nitrogen starvation on the function and organization of the photosynthetic membranes in *Cryptomonas maculata* (*Cryptophyceae*). Planta 169, 361-369.
- Richter, G. (1996)** Biochemie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M.R. (2009)** Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 102 (1), 100-112.
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J. & Horton, P. (1999)** Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. J. Biol. Chem. 274, 10458-10465.
- Sakamoto, T. & Bryant, D.A. (1998)** Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. Arch. Microbiol. 169, 10–19.
- Sakamoto, T., Higashi, S., Wada, H., Murata, N. & Bryant, D.A. (1997)** Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. FEMS Microbiol. Lett. 152, 313–320.
- Sato, N. and Murata, N. (1980)** Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in term-adaptation. Biochim. Biophys. Acta 619, 353–366.
- Sattler, S.E., Cahoon, E.B., Coughlan, S.J. & DellaPenna, D. (2003)** Characterization of Tocopherol Cyclases from Higher Plants and Cyanobacteria. Evolutionary Implications for Tocopherol Synthesis and Function. Plant Physiol. 132, 2184–2195.
- Sauer, J., Schreiber, U. Schmid, R., Völlker, U. & Forchhammer, K. (2001)** Nitrogen Starvation-Induced Chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-Level Photosynthesis As a Mechanism of Long-Term Survival. Plant Physiol. 126, 233–243.
- Schneider, C. (2005)** Chemistry and biology of vitamin E. Mol. Nutr. Food Res. 49, 7–30.
- Schneider, J.C. & Roessler, P. (1994)** Radiolabeling Studies of Lipids and Fatty Acids in *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*), an Oleaginous Marine Alga. J. Phycol. 30 (44), 594-598.
- Schneider, J.C. & Roessler, P.G. (1995)** “A novel acyltransferase activity in an oleaginous alga.” In Plant Lipid Metabolism (Kader, L.C.; Mazliak, P., eds.), Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 105-107.

- Schneider, J.C.**, Livine, A., Sukenik, A. & Roessler P.G. (1995) "A mutant of *Nannochloropsis* deficient in eicosapentaenoic acid production." *Phytochem.* 40, 807-814.
- Schreiber, U.**, Bilger, W. & Neubauer, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.-D. and Caldwell, M. M. (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis. Series Ecological Studies*, 100, 49-70. Springer Verlag, Berlin.
- Seto, A.**, Kumasaka, K., Hosaka, M., Kojima, E., Kashiwakura, M. & Kato, T. (1992) Production of eicosapentaenoic acid by a marine microalgae and its commercial utilization for aquaculture. In: Kyle, D.J., Raledge, C. (Eds), *Industrial Applications of Single Cell Oils*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 219-234.
- Seto, A.**, Wang, H.L. & Hesseltine, C.W. (1984) Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 892-894.
- Sheehan, J.**, Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P.G. (1998) US Department of Energy's Office of Fuels Development, July 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae, Close Out Report TP-580-24190. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.
- Shigeoka, S.**, Onishi, T., Nakano Y. & Kitaoka S., (1986) The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. *Agr. Biol. Chem.* 50, 1063-1065.
- Shintani, D.K.**, Cheng, Z. & DellaPenna, D. (2002) The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Letters*, 511 (1), 1-5.
- Siefermann, D. & Yamamoto, H.Y.** (1975) Properties of NADPH and oxygen-dependent Zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 70-77.
- Siefermann-Harms, D.** (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69, 561-568.
- Sijtsma, L. & de Swaaf, M.E.** (2004) Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 146–153.
- Smirnoff, N.** (2000) Ascorbat biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355, 1455-1464.
- Solovchenko, A. E.**, Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. & Merzlyak, M.N. (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *J. Appl. Phycol.* 20, 245–251.

- Srinivasakumar, K.P. & Rajashekhar, M. (2009)** In vitro studies on bactericidal activity and sensitivity pattern of isolated marine microalgae against selective human bacterial pathogens. *Indian J. Sci. Technol.* 2 (8), 16-23.
- Suda, S., Atsumi, M. & Miyashita, H. (2002)** Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (*Eustigmatophyceae*). *Phycologia* 41, 273-279.
- Suen, Y., Hubbard, J. S., Holzer, G. & Tornabene, T.G. (1987)** Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *J. Phycol.* 22 (2), 289-296.
- Sukenik, A. & Carmeli, Y. (1990).** Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*) grown in a light-dark cycle. *J. Phycol.* 26, 463-469.
- Sukenik, A. (1991)** Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). *Bioresource Technol.* 35 (33), 263-269.
- Sukenik, A. (1999)** Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: Cohen Z (ed) *Chemicals from microalgae*. Taylor and Francis, London, 41-56.
- Sukenik, A., Yamaguchi, Y. & Livne, A. (1993a)** Alterations in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp.. *J. Phycol.* 29, 620-626.
- Sukenik, A., Zmora, O. & Carmeli, Y., (1993b)** Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp.. *Aquaculture* 117, 313-326.
- Teshima, S., Yamasaki, S., Kanazawa, A., Koshio, S. & Mukai, H. (1991)** Fatty acid composition of Malaysian marine *Chlorella*.. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1985.
- Thompson, G.A. (1996)** Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302, 17-45.
- Thompson, J.E., Legge, R.L. & Barber, R.F. (1987)** The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105, 317-344.
- Thompson, P.A., Guo, M.-X., Harrison, P.J. & Whyte, J.N.C. (1992)** Effects of variations in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28, 488-497.
- Tong, Y., Zhou, J.J. Li, Z. & Miller. A.J. (2005)** A two-component highaffinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.* 41, 442-450.

- Tornabene, T.G.,** Holzer, G., Lien, S. & Burris, N. (1983) Lipid Composition of the Nitrogen Starved Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 435-440.
- Trautman, J.K.,** Shreve, A.P., Owens, T.G. & Albrecht, A.C. (1990) Femtosecond dynamics of carotenoid-tochlorophyll energy transfer in thylakoid membrane preparations from *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis* sp.. *Chem. Phys. Lett.* 166, 369-374.
- Trebst, A.** (2003) Function of β -Carotene and Tocopherol in Photosystem II. *Z. Naturforsch.* 58c, 609-620.
- Trebst, A.,** Depka, B. & Holländer-Czytko, H. (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters.* 516, 156-160.
- Tsujimoto, R.,** Yamazaki, H., Maeda, S. & T. Omata (2007) Distinct roles of nitrate and nitrite in regulation of expression of the nitrate transport genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 48, 484–497.
- van Beusekom, J.E.E., Brockmann, U.H.** (1998) Transformation of Phosphorus in the Elbe Estuary, *Estuaries*, 21 (4A), 518-526.
- van Kooten, O. & Snel, J.F.H.** (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147-150.
- Vanselow, K.H.** (1993) The effect of N-nutrients on the acceptor pool of PSI and thylakoid energization as measured by chlorophyll fluorescence of *Dunaliella salina*. *J. Exp. Bot.* 44 (265), 1331-1340.
- Verhoeven, A.S.,** Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. (1997) Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol.* 113, 817-824.
- Volkman, J.K.,** Brown, M.R., Dunstan, G.A. & S. W. Jeffrey, S.W. (1993) The biochemical composition of marine microalgae from the class *Eustigmatophyceae*. *J. Phycol.* 29, 69-78.
- Wada, H. & Murata, N.** (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* 92, 1062–1069.
- Wada, H. & Murata, N.** (1998) Membrane lipids in cyanobacteria. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (Siegenthaler, P.A. and Murata, N., eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 65–81.
- Wada, H.,** Gombos, Z. & Murata, N. (1994) Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4273–4277.

- Wang, X. & Quinn, P.J. (1999)** Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 38, 309-336.
- Wang, X. & Quinn, P.J. (2000)** The location and function of vitamin E in membranes. *Mol. Membr. Biol.* 17, 143-156.
- Watanabe, T. (1993)** Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 152–161.
- Weber, A.P.M., Schwacke, R. & Flügge, U.I. (2005)** Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu. Rev. Plant Biology*, 56, 133-164.
- Whittle, S.J. & Casselton, P.J. (1975)** The chloroplast pigments of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Xanthophyceae*. I. *Eustigmatophyceae*. *Br. Phycol J.* 10, 179-191.
- Wilhelm C. (1990)** The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. *Plant Physiol. Biochem.* 28, 293-306.
- Wollman, F.A. (2001)** State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* 20 (14), 3623-3630.
- Wray, J. L., & J. R. Kinghorn (1989)** Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Oxford Science Publications, Oxford, United Kingdom.
- Xu F., Cai, Z.L. , Cong, W. & Ouyang, F. (2004)** Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 26, 1319-1322.
- Yahyaoui, W., Harnois, J. & Carpentier, R. (1998)** Demonstration of thermal dissipation of absorbed quanta during energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthetic membranes. *FEBS Lett.* 440, 59-63.
- Yamamoto, H.Y. & Chichester, C.O. (1965)** Dark incorporation of $^{18}\text{O}_2$ into antheraxanthin by bean leaf. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 303-305.
- Yordanov, I., Dilova, S., Petkova, R., Pangelova, T., Goltsev, V. & Süß, K.-H. (1986)** Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochem. Photobiophys.* 12, 147-155.
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A. & Cohen, Z. (2002)** Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol.* 38, 325–331.
- Zheng, K., Zhu, X., Han, D., Yang, Y., Lei, W. & Xie, S. (2010)** Effects of dietary lipid levels on growth, survival and lipid metabolism during early ontogeny of *Pelteobagrus vachelli* larvae. *Aquaculture* 299 (1-4), 121-127.

Zhou, J.J., Fernandez, E., Galvan, A. & Miller, A.J. (2000) A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. FEBS Lett. 466, 225–227.

Zhu, C.J., Lee, Y.K. & Chao, T.M. (1997) Effect of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. J. Appl. Phycol. 9, 451–457.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Franciscus Colijn bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Universität Kiel in Büsum.

Herrn Dr. Klaus Vanselow danke ich für die administrative Unterstützung, welche die Durchführung dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. Darüber hinaus bedanke ich mich für die lektorale Arbeit am Manuskript.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Kai Marxen für die Einweihung in die Technik des Reihenphotobioreaktors, für die stets gewährten wissenschaftlichen Gespräche und für die kompetente Unterstützung beim Verfassen der Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Sebastian Lippemeier und Herrn Dr. Ralf Hintze (Fa. BlueBioTech GmbH) für die maßgebliche Beteiligung an der Themenbildung dieser Arbeit und für den Beitrag wissenschaftlicher Ansatzpunkte bedanken. Ferner bedanke ich mich für das Bereitstellen von wichtigen technischen Hilfsmitteln.

Mein anerkennender Dank gilt Britta Egge für die geduldige Einführung in nahezu alle labortechnische Anwendungen, insbesondere in die HPLC, sowie für die Bestimmung zahlreicher Nährstoffproben.

Vielen Dank an Jens Hermann, aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bilger an der CAU Kiel, für die Unterstützung bei der Analyse der Tocopherolproben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungs- und Technologiezentrums Westküste in Büsum für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

LEBENS LAUF

Maren Hoffmann

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 3.11.1974

Geburtsort: Güstrow

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1981 - 1991	Polytechnische Oberschule (EOS) Mühl-Rosin
1991 - 1993	Ernst-Barlach-Gymnasium Güstrow (Abschluss: Abitur)
1994 - 1999	Biologiestudium an der Universität Rostock (Abschluss: Diplom)
05/98 - 05/99	Diplomarbeit - Evaluierung verschiedener Isolate von <i>Serratia plymuthica</i> als „Biological Control Agent“ im biologischen Pflanzenschutz - am Institut für Biowissenschaften unter Leitung von Prof. Bahl und Dr. Berg
12/99 - 12/01	Mitarbeit an dem Projekt „Funktionelle Charakterisierung humaner Krab – Zinkfinger Gene“
04/01 - 12/01	Mitarbeit in einem Teilprojekt des BMBF – Leitverbundprojektes „Proteom – Analyse des Menschen“; Mitwirkung im BMBF – Verbundprojekt „Automatisiertes Laser Mikrodisektions – und Katapultiersystem“
12/03 - 02/04	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungs- und Technologiezentrum (FTZ) Westküste, Büsum
04/04 - 02/05	Forschungsassistentin bei der Fa. Linde im Aufgabengebiet Food (SDF) in Zusammenarbeit mit der Fa. ECOMARES in Büsum; Bericht: „An impact of ozonation on pathogens in a marine recirculating system“
03/05 – 08/05	Werkvertrag mit dem FTZ Büsum - Mitarbeit an der MAKS (Mikroalgenkultursammlung) – Datenbank
01/06 – 06/09	Wissenschaftliche Angestellte am FTZ in Büsum (CAU zu Kiel); Anfertigung der Doktorarbeit unter Leitung von Prof. R. Schulz (Botanisches Institut der CAU zu Kiel)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und dabei als Hilfsmittel nur die genannten Quellen benutzt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder ganz noch zum Teil bei anderen Stellen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Kiel, März 2010