Untersuchung zur Sekretion und Abtrennung von Lipiden aus Mikroalgen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Christian Kleinert

aus Wurzen

Göttingen, 2021

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Thomas Friedl, Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen (SAG), Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Carola Griehl, Biochemie, Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik, Hochschule Anhalt

Prof. Dr. Ivo Feußner, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent:	Prof. Dr. Thomas Friedl, Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen (SAG), Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen
Korreferentin:	Prof. Dr. Carola Griehl, Biochemie, Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik, Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie, Hochschule Anhalt, Köthen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Prof. Dr. Ivo Feußner, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

2. PD Dr. Franz Hadacek, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

3. Prof. Dr. Kai Heimel, Abteilung Mikrobielle Zellbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

4. Prof. Dr. Jan de Vries, Abteilung Angewandte Bioinformatik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2022

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen einer kooperativen Promotion zwischen dem Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt unter Betreuung von Prof. Dr. Carola Griehl und der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen (SAG) des Albrecht-von-Haller-Institut unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas Friedl.

Zunächst möchte ich mich im besonderen Maß bei Herrn Prof. Dr. Thomas Friedl bedanken, welcher mir die Anfertigung meiner Promotion an der Fakultät für Biologie und Psychologie der Georg-August-Universität Göttingen ermöglicht hat. Ungeachtet der örtlichen Entfernung zwischen Köthen und Göttingen standen Sie mir in allen Belangen mit bestem Rat und Tat zur Seite, haben mich bedingungslos in Ihre Arbeitsgruppe und den Lehrbetrieb integriert und wiesen mir den zielgerichteten Weg in fachlichen Diskussionen als Erstgutachter meiner Promotion. Dafür gilt Ihnen mein herzlichster Dank.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Carola Griehl für die Aufnahme in ihr Forschungsteam am Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt bereits während meines Bachelorstudiums der Biotechnologie. Unentwegt haben Sie sich für meine wissenschaftliche und persönliche Weiterentwicklung während meines Bachelor-, Master- und Promotionsstudiums eingesetzt, mich gefördert, gefordert und mir über die ganzen Jahre finanzielle Sicherheit geboten. Sie gaben mir den Raum und die Möglichkeit aus vollen Ressourcen zu schöpfen und mich wissenschaftlich selbst und uneingeschränkt entfalten zu können. Ohne Ihr stetiges Engagement in meine Person wäre all dies nicht möglich gewesen. Für dieses Vertrauen, die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche und Diskussionen gilt Ihnen mein größter Dank.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner von der Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen für die Beteiligung an meinem Betreuungskomitee, für die Beteiligung an meiner Prüfungskommission und für die fachlichen Hinweise zu meiner Dissertation bedanken. In diesem Sinne bedanke ich mich auch ganz recht herzlich bei Herrn Dr. Franz Hadacek, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen, bei Herrn Prof. Dr. Kai Heimel, Abteilung Mikrobielle Zellbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen und bei Herrn Prof. Dr. Jan de Vries, Abteilung Angewandte Bioinformatik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen für die Zusage zur Beteiligung an meiner Prüfungskommission.

Mein größter Dank geht an die Mitarbeiter der Hochschule Anhalt und der Georg-August-Universität Göttingen. Ganz herzlichen Dank Mario Salisch für die Pflege meiner *Botryococcus braunii* Kulturen in der Köthener Algenstammsammlung, lieben Dank Simone Bieler für die fachliche und organisatorische Unterstützung, danke Juliane Poturnak für die Bearbeitung unzähliger Kohlenwasserstoffproben, herzlichen Dank Birgit Olberg für die DNA-Extraktion und Sequenzierung meiner *Botryococcus braunii* Stämme, vielen Dank Franziska Büschelberger, Mercedes Scharfe, Frank Langguth, Marco Hoffmann, Steffen Töpperwien, Claudia Tilliger, Anita Czech, Paula Lorek, Jonas Breuer, Stefan Zebbedies, Stefanie Hielscher-Michael und Maike Lorenz.

In besonderem Maß bedanke ich mich bei meinen Mitpromovierenden Anna-Lena Höger und Alexander Kettner für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche, Ratschläge und die Hilfe. Vielen Dank euch beiden für die entstandenen Freundschaften.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen engsten Freunden Martin König, Jens Jachmann, Chris Möller, Cindy Röhrborn und Stefan Matthes. Vielen Dank, dass ihr in dieser nicht immer einfachen Zeit für mich da wart, immer ein offenes Ohr hattet, mich unterstützt, aufgebaut und mir Zuspruch gegeben habt. Vielen Dank für die unvergesslichen gemeinsam verbrachten Momente.

Vielen Dank, liebe Sindy, für deine tägliche bedingungslose Unterstützung in fachlicher und mentaler Hinsicht. Vielen Dank für dein Verständnis, die aufmunternden Worte und Taten, deine Begeisterung für mein Forschungsthema und die unzähligen Male, die du diese Arbeit lesen musstest. Vielen Dank, dass du auf diesem Weg an meiner Seite warst.

Mein allergrößter Dank ist an meine geliebte Familie gerichtet, meine Eltern Andrea und Volker, meine Schwester Stefanie und meinen Schwager Sven, mein Neffe Quentin und meine Nichte Liné, meine Großeltern Helga und Lothar. Ihr habt mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützt und über die Mitgabe von Werten und Tugenden zu dem Menschen werden lassen, der ich jetzt bin und der seine Promotion ablegen darf. Unendlichen Dank dafür!

Christian Kleinert

Inhaltsverzeichnis

Nomenklatur 13

Kurzfassung 17

1 Allgemeine Einleitung 19

1.1 Hintergrund 19

1.2 Zielstellung 21

2 Grundlagen und Stand der Wissenschaft 22

2.1 Status quo der Algenbiotechnologie 22

2.2 Extrazelluläre Verbindungen in Mikroalgen 25

2.2.1 Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) 25

2.2.2 Extrazelluläre Proteine und Enzyme 28

2.2.3 Extrazelluläre Lipide 29

2.2.4 Extrazelluläre organische Säuren, Phytohormone und allelopathische Substanzen 30

2.3 Die Grünalge *Botryococcus braunii* 32

2.3.1 Charakterisierung der Grünalge *Botryococcus braunii* 34

2.3.2 Phylogenetische Charakterisierung 35

2.3.3 Synthese extrazellulärer Kohlenwasserstoffe 37

2.3.4 Kohlenwasserstoffsekretion der A- und B-Race Stämme 42

2.3.5 Koloniebildung 45

2.3.6 Einflussgrößen auf das Wachstum sowie auf die Bildung und Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* 47

2.4 Milking (*in situ*-Extraktion) von Mikroalgen 49

2.4.1 Potenzielle Algenstämme und Stammauswahl für das Verfahren des Milkings 51

2.4.2 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels 53

2.4.3 Extraktionssysteme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion 55

3 Material und Methoden 58

3.1 Phylogenetische Analyse der ITS2-Regionen 58

3.1.1 DNA-Extraktion, PCR Amplifikation und Sequenzierung 58

3.1.2 Analyse der ITS2-Regionen 59

3.2 Kultivierung 61

3.2.1 Algenstämme 61

3.2.2 Nährmedien 62

3.2.3 Kultivierungssysteme 64

3.3 *In situ*-Extraktion (Milking) 65

3.3.1 Verfahren der *in situ*-Extraktion 65

3.3.2 Extraktionssysteme 66

3.4 Analytische Methoden 67

3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse 67

3.4.2 Ermittlung des Gehaltes extrazellulärer Kohlenwasserstoffe 67

3.4.3 Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes 68

3.4.4 Bestimmung der Nährstoffkomponenten 68

3.4.5 Bestimmung der Lösungsmittelkompatibilität 69

3.4.6 Ermittlung der Sauerstoffproduktivität 69

3.4.7 Mikroskopie und Ermittlung der Koloniegröße 69

3.5 Berechnungen 70

3.5.1 Berechnung der Biomasseproduktivität und des Nährstoffverbrauchs 70

3.5.2 Berechnung der effektiven Extraktionszeit und -oberfläche 71

3.6 Experimentelle Durchführung 74

3.7 Rangliste zur Identifizierung geeigneter *Botryococcus braunii* Stämme 76

3.8 Auswertung und Statistik 76

4 Ergebnisse 77

4.1 Phylogenetische Analyse der ITS2-Region bei *Botryococcus braunii* 77

4.1.1 Phylogenetische Analyse der Primärstruktur der Untersuchten ITS2-Sequenzen 77

4.1.2 Analyse der Sekundärstruktur der betrachteten ITS2-Sequenzen 80

4.1.3 Betrachtung der klimatischen Bedingungen am Isolationsort der untersuchten ITS2-Sequenzen 83

4.2 Identifizierung von geeigneten *Botryococcus braunii* Stämmen für das Verfahren der *in situ*-Extraktion 88

4.2.1 Wachstum und Nährstoffverbrauch 88

4.2.2 Lipide und extrazelluläre Kohlenwasserstoffe 92

4.2.3 Lösungsmittelverträglichkeit 94

4.2.4 Extrahierbarkeit extrazellulärer Kohlenwasserstoffe 95

4.2.5 Ranking 96

4.3 Mikroskopische Untersuchung der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 97

4.3.1 Vergleich der morphologischen Eigenschaften 97

4.3.2 Mikroskopische Untersuchung zur Koloniebildung und der Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe von *Botryococcus braunii* Bot22 99

4.4 *In situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter optimierter Extraktionszeit im Labormaßstab 102

4.4.1 Optimierung der Extraktionszeit 103

4.4.2 *In situ*-Extraktion unter optimaler Extraktionszeit 107

4.5 Scale-up der Kultivierung und *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 auf 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktoren 111

4.5.1 Wachstum der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 in 6,0 L FPA-Reaktoren 112

4.5.2 Übertragung der *in situ*-Extraktion auf 6,0 L FPA-Reaktoren 115

4.5.3 Untersuchung zum Einfluss des Düsendurchmessers auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion 116

4.5.4 *In situ*-Extraktion unter optimalem Düsendurchmesser bei glatter und rauer Extraktionssäule 119

4.6 Optimierung der Kultivierungsbedingungen der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 124

4.6.1 Temperatur 124

4.6.2 Hell-Dunkel-Zyklus 127

4.6.3 Nährstoffe 130

4.6.4 Kultivierung unter optimierten Bedingungen 136

4.7 Langzeit *in situ*-Extraktion des Stammes Showa in 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktoren unter optimierten Kultivierungs- und Extraktionsbedingungen 139

5 Diskussion 142

5.1 Phylogenetische Analyse von *Botryococcus braunii* 142

5.2 Auswahl geeigneter *Botryococcus*-Stämme zur *in situ*-Extraktion 147

5.3 Koloniebildung und Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* 152

5.4 Optimierung der Einflussgrößen für die *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 156

5.4.1 Ermittlung der optimalen Extraktionszeit 157

5.4.2 Optimierung des Partikeldurchmessers 161

5.5 Optimierung der Kultivierungsbedingungen von *Botryococcus braunii* 165

5.5.1 Einfluss des Lichteintrags (Scale-up) und des Hell/Dunkel-Zyklus 165

5.5.2 Einfluss der Temperatur 168

5.5.3 Einfluss der initialen Nährstoffkonzentration 169

5.5.4 Zusammenführung der Kultivierungsoptimierungen von Temperatur, Hell/Dunkel-Zyklus und initialer Nährstoffkonzentration 172

5.6 *In situ*-Extraktion unter optimierten Extraktions- und Kultivierungsbedingungen 173

6 Zusammenfassung und Ausblick 176

7 Literaturverzeichnis 178

Anhang 197

Nomenklatur

Bezeichnung	Einheit	Beschreibung
α	[-]	Amplitude
ACOI	[-]	Coimbra Collection of Algae
$A_{EXT,eff}$	[m^2]	effektive Extraktionsfläche (Phasengrenzfläche)
AIC	[-]	Akaike Information Criterion
Am	[-]	Tropisches Regenklima
Ar	[-]	Archimedes-Zahl
$At_{EXT,eff}$	[m^2 s L^{-1}]	Extraktionszahl
ATP	[-]	Adenosintriphosphat
Aw	[-]	Tropisches Regenklima, wintertrocken
c	[g L^{-1}] [g g^{-1}] [%]	Konzentration
$c_{EKW,EXT}$	[g L^{-1}]	Konzentration extrahierter extrazellulärer Kohlenwasserstoffe
$c_{EKW,max}$	[g L^{-1}]	Maximale Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe
$c_{L,max}$	[g L^{-1}]	Maximale Lipidkonzentration
c_N	[g L^{-1}]	Stickstoffkonzentration
c_P	[g L^{-1}]	Phosphorkonzentration
c_X	[g L^{-1}]	Biotrockenmassekonzentration
$c_{X,Start}$	[g L^{-1}]	Startbiotrockenmassekonzentration
CBC	[-]	Compensatory Base Changes
CCALA	[-]	Culture Collection of Autotrophic Organisms
CCAP	[-]	Culture Collection of Algae and Protozoa
Cfa	[-]	Immerfeuchtes, warmgemäßigtes Klima mit heißen Sommern
Cfb	[-]	Immerfeuchtes, warmgemäßigtes Klima mit warmen Sommern
Csc	[-]	Sommertrockenes, warmgemäßigtes Klima mit kurzen Sommern
Cwb	[-]	Wintertrockenes, warmgemäßigtes Klima mit warmen Sommern
CrtB	[-]	Phytoensynthase
CTP	[-]	Cytidintriphosphat
d_{Disp}	[m] [mm]	Durchmesser des Dispergierers
d_N	[m] [mm]	Düsendurchmesser
d_P	[m] [mm]	Partikeldurchmesser
$d_{P,min}$	[m] [mm]	minimaler Partikeldurchmesser
d_{S32}	[m] [mm]	Sauter-Durchmesser
Dfb	[-]	Immerfeuchtes, boreales Klima mit warmen Sommern
DHA	[-]	Decosahexaensäure
DHDDS	[-]	Dehydrodolichyldiphosphat-Synthase
DMAPP	[-]	Dimethylallylpyrophosphat
dO_2	[mg]	gelöster Sauerstoff
DOXP	[-]	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	[-]	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase
DXS	[-]	Desoxyxylulosephosphat-Synthase
EFSA	[-]	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ENO	[-]	Enolase
EPA	[-]	Eicosapentaensäure
EPS	[-]	extrazelluläre Polysaccharide
EKW	[-]	extrazelluläre Kohlenwasserstoffe
ER	[-]	endoplasmatisches Retikulum
ET	[-]	Tundrenklima, kalte Klimate
η_K	[Pa s]	Viskosität der kontinuierlichen Phase
F_A	[N]	Auftriebskraft
F_η	[N]	Zähigkeitskraft
F_T	[N]	Trägheitskraft

Bezeichnung	Einheit	Beschreibung
F_σ	[N]	Oberflächenspannungskraft
FACHB	[-]	Freshwater Algae Collection at the Institute of Hydrobiology
Fd_{ox}	[-]	Ferredoxin oxidiert
Fd_{red}	[-]	Ferredoxin reduziert
FDPS	[-]	Dimethylallyltranstransferase
FPA	[-]	Flat-Panel-Airlift
g	[m s^{-2}]	Erdbeschleunigung
GAPDH	[-]	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDPS	[-]	Guanosindiphosphat-Synthase
GGDPS	[-]	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
GTR	[-]	General Time Reversible Model
h_S	[m]	Lösungsmittelhöhe
Hz	[s^{-1}]	Hertz
Id_i	[-]	Isopentenyldiphosphat-Isomerase
IPP	[-]	Isopentenylpyrophosphat
IspD	[-]	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Cytidylyltransferase
IspE	[-]	4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythrit-Kinase
IspF	[-]	2-C-Methyl-D-erythrol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG	[-]	4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat-Synthase
IspH	[-]	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Reduktase
ITS	[-]	Internal Transcribed Spacer
k	[-]	Faktor für die Biomasseakkumulation
K_F	[-]	Flüssigkeitskennzahl
KASC	[-]	Köthener Algae Strain Collection
KW	[-]	Kohlenwasserstoffe
$logP_{Oct}$	[-]	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MCMC	[-]	Markov-Chain-Monte-Carlo Methode
MEP	[-]	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
ML	[-]	Maximum-Likelihood Methode
MP	[-]	Maximum-Parsimony Methode
NCBI	[-]	National Center for Biotechnology Information
NADP	[-]	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP+	[-]	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidiert
NADPH	[-]	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert
NJ	[-]	Neighbor-Joining Methode
P	[g L^{-1} d^{-1}] [g g^{-1} d^{-1}]	volumenbezogene/massebezogene Produktivität
P_L	[mg L^{-1} d^{-1}]	Lipidproduktivität
$\bar{P}_X$	[g L^{-1} d^{-1}]	Mittlere volumetrische Biomasseproduktivität
$P_{X,max}$	[g L^{-1} d^{-1}]	maximale volumetrische Biomasseproduktivität
P_{EKW}	[mg L^{-1} d^{-1}]	Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe
PAM	[-]	Puls-Amplituden-Modulations Fluorometrie
PCC	[-]	Pasteur Culture Collection
PCR	[-]	Polymerase-Kettenreaktion
PDSS1	[-]	Decaprenyldiphosphat-Synthase-Untereinheit 1
PGAM	[-]	Phosphoglyceratmutase
PGK	[-]	Phosphoglyceratkinase
PK	[-]	Pyruvatkinase
PP_i	[-]	Pyrophosphat
PTFE	[-]	Polytetrafluorethylen
R	[-]	Ranglistenpunkt
Re	[-]	Reynolds-Zahl
Re_P	[-]	Reynolds-Zahl (Partikel)
rER	[-]	Raues endoplasmatisches Retikulum

Bezeichnung	Einheit	Beschreibung
RNA	[-]	Ribonukleinsäure
rRNA	[-]	ribosomale Ribonukleinsäure
ρ	[kg m^{-3}]	Dichte
ρ_D	[kg m^{-3}]	Dichte der dispersen Phase
ρ_K	[kg m^{-3}]	Dichte der kontinuierlichen Phase
$\Delta\rho$	[kg m^{-3}]	Dichtedifferenz
rpm	[-]	Umdrehungen pro Minute
SAG	[-]	Culture Collection of Algae at University Göttingen
SC	[-]	Lösungsmittelkompatibilität
SCCAP	[-]	Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa
SDPS	[-]	Solanesyldiphosphat-Synthase
σ	[N m^{-1}]	Oberflächenspannung
SQS	[-]	Squalensynthase
SSL-1	[-]	Presqualendiphosphat-Synthase 1
SSL-2	[-]	Presqualendiphosphat-Synthase 2
SSL-3	[-]	Presqualendiphosphat-Synthase 2
T	[°C] [K]	Temperatur
t_C	[d]	Kultivierungszeit
$t_{EXT,eff}$	[s]	effektive Extraktionszeit
U_N	[g L^{-1} d^{-1}]	Stickstoffverbrauchsrate
U_P	[g L^{-1} d^{-1}]	Phosphorverbrauchsrate
$U_{N,P,max}$	[g L^{-1} d^{-1}]	maximale Verbrauchsrate an Stickstoff bzw. Phosphor
UTEX	[-]	Culture Collection of Algae at University of Texas
V	[m^3]	Volumen
V_R	[m^3] [L]	Reaktorvolumen
V_P	[m^3]	Partikelvolumen
V_{EXT}	[m^3] [L]	Extraktionsvolumen
$\dot{V}$	[m^3 s^{-1}]	Volumenstrom
$\dot{V}_D$	[m^3 s^{-1}]	Volumenstrom der dispersen Phase
$\dot{V}_{Susp}$	[m^3 s^{-1}]	Suspensionsvolumenstrom
vvm	[vvm]	Begasungsrate (Volumenstrom Gas je Volumen Kulturmedium)
w_{krit}	[m s^{-1}]	Durchströmungsgeschwindigkeit Strahlenzerfall
w_N	[m s^{-1}]	Geschwindigkeit in der Düsenöffnung
w_r	[m s^{-1}]	Relativgeschwindigkeit
We	[-]	Weber-Zahl
We_N	[-]	Weber-Zahl (Partikelbildung)
X	[g]	Biotrockenmasse
Y	[g g^{-1}]	Ausbeute (engl. Yield)
Y_{EKW}	[g g^{-1}]	Ausbeute an extrazellulären Kohlenwasserstoffen
Y_{Lipid}	[g g^{-1}]	Ausbeute an Lipiden

Kurzfassung

Aufgrund der hohen Aufarbeitungskosten ist die Herstellung von niedrigpreisigen Produkten aus Mikroalgen zum aktuellen Zeitpunkt nicht rentabel. Eine Möglichkeit zur Reduzierung der Aufarbeitungskosten stellt das Verfahren der *in situ*-Extraktion (Milking) von Mikroalgen dar, bei dem das von den Algenzellen in das umgebende Medium sekretierte Wertprodukt direkt während der Kultivierung abgetrennt wird, ohne die Zellen zu zerstören. Dadurch können die energieintensiven Schritte der Ernte, Trocknung und des Zellaufschlusses der herkömmlichen Prozesskette eingespart werden. Eine geeignete Mikrolage für dieses Verfahren stellt die Grünalge *Botryococcus braunii* dar, welche langkettige Kohlenwasserstoffe in einer extrazellulären Matrix um die Zellen herum anlagert. Diese Arbeit beschreibt die Auswahl von geeigneten *Botryococcus braunii* Stämmen für das Verfahren der *in situ*-Extraktion, die Untersuchungen zur Aufklärung der Kohlenwasserstoffsekretion sowie den phylogenetischen Zusammenhang der unterschiedlichen Kohlenwasserstoffe, welche durch diese Alge gebildet und sekretiert werden. Des Weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit der Optimierung der Kultivierungsbedingungen ausgewählter *Botryococcus braunii* Stämme sowie dem Scale-up des Verfahrens der *in situ*-Extraktion vom Labor- in den semi-technischen Maßstab unter Optimierung der Extraktionszeit und des Partikeldurchmessers.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter den zwölf untersuchten Stämmen die Isolate Showa und Bot22 am besten geeignet für das Verfahren der *in situ*-Extraktion erscheinen. Bei beiden Stämmen konnte ein ähnlicher Verlauf der Kohlenwasserstoffsekretion, welcher vorwiegend während der Zellteilung stattfindet, festgestellt werden. Anhand der phylogenetischen Analyse der primären und sekundären Struktur der Internal Transcribed Spacer 2 Regionen der rRNA konnten zwei Clades (A und BL) sowie sechs Subclades (A1, A2, B1, B2, L1 und L2) innerhalb des Stammes *Botryococcus braunii* ermittelt werden, welche unterschiedlichen Stoffwechselwege der Kohlenwasserstoffsynthese vermuten lassen. Über die Optimierung der Extraktionszeit anhand der Berechnung eines vom Kultivierungssystem unabhängigen Extraktionskoeffizienten konnte das Verfahren der *in situ*-Extraktion für beide Stämme erfolgreich vom Labormaßstab (3,0 L Blasensäulenreaktor) in den semi-technischen Maßstab (6,0 L Flat-Panel-Airlift-Reaktor) überführt werden. Unter Zusammenführung aller Optimierungsschritte konnte eine *in situ*-Extraktion mit dem Stamm Showa über 80 Tage bei einer Gesamtkohlenwasserstoffausbeute von ca. 125 % der im Kultivierungssystem befindlichen Biomasse erzielt werden. Die Extraktion eines höheren Gehaltes an Kohlenwasserstoffen verglichen zu der im System befindlichen Biomasse bestätigt dabei die Funktionalität der wiederholten, zerstörungsfreien Extraktion von extrazellulären Verbindungen aus Mikroalgen.

Abstract

Due to the high costs of downstream processing, the production of low-value substances from microalgae is currently not economically feasible. On opportunity to reduce the downstream costs is the process of *in situ*-extraction or milking of microalgae. During this process, the valuable product, which is secreted by the algae cell to the surrounding media, is directly extracted during the cultivation without destroying the cells. With this method, the energy intensive steps of harvesting, dewatering and cell disruption of the conventional process chain can be saved. A suitable microalga for this process is the green algae *Botryococcus braunii* which accumulates long chain hydrocarbon in an extracellular matrix around the cells. This work shows the selection of a suitable *Botryococcus braunii* strain for the process of *in situ*-extraction, the elucidation of the hydrocarbon secretion as well as the phylogenetic connection of the different hydrocarbon structures produced by this alga. Furthermore, this work deals with the optimization of the cultivation conditions of selected *Botryococcus braunii* strains, as well as the scale-up of the *in situ*-extraction process from laboratory to semi-technical scale under optimization of the extraction time and particle diameter.

The results show, that of the twelve strains examined, the Showa and Bot22 isolates appear to be most suitable for the *in situ*-extraction process. An identical course of hydrocarbon secretion, which predominantly takes place during cell division, could be determined for both strains. Based on the phylogenetic analysis of the primary and secondary structure of the internal transcribed spacer 2 regions of the rRNA, two clades (A and BL) and six subclades (A1, A2, B1, B2, L1 and L2) were determined within the strain *Botryococcus braunii*, which indicates different metabolic pathways used by the different races of *Botryococcus braunii* for the hydrocarbon synthesis. By optimizing the extraction time based on the calculation of an extraction coefficient that is independent of the cultivation system, the *in situ*-extraction process for both strains was successfully transferred from the laboratory scale (3.0 L bubble column reactor) to the semi-technical scale (6.0 L flat panel airlift reactor). By combining all the optimization steps, an *in situ*-extraction with the strain Showa over 80 days under a total hydrocarbon yield of approx. 125 % of the biomass in the cultivation system could be achieved. The extraction of a higher content of hydrocarbons compared to the biomass concentration in the cultivation system confirms the functionality of the repeated, non-destructive extraction of extracellular compounds from microalgae.

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Nutzung von nachhaltig erzeugter Biomasse als Lieferant von für den Menschen nutzbaren Biomolekülen gewinnt mit Hinblick auf immer knapper werdende Rohstoffreserven und den voranschreitenden Klimawandel stetig an Bedeutung. Mikroalgen bieten für die Erzeugung dieser Biomasse ein enormes Potential, da diese im Vergleich zu höheren Pflanzen das zur Verfügung stehende Licht weitaus effizienter verwerten können, um kohlenstoffbasierte Biomoleküle wie Lipide und Kohlenhydrate aufzubauen. Des Weiteren sind Mikroalgen die am schnellsten wachsenden phototrophen Organismen und gewinnen aus biotechnologischer Sicht stetig an Bedeutung (Chisti 2020).

Trotz der vielen Vorteile von Mikroalgen gegenüber klassischen Energiepflanzen wie Raps oder Mais (Fon Sing et al. 2013; Griehl and Bieler 2011; Li et al. 2008; Rosello Sastre and Posten 2010), beschränkt sich deren Nutzung und großtechnische Produktion fast ausschließlich auf die Biomasse selbst sowie hochpreisige Biomoleküle wie Carotinoide oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche im Bereich der Kosmetika, Nahrungsergänzungsmittel oder Fischzucht Anwendung finden (Borowitzka 2013; Borowitzka 2018a). Die Gründe hierfür liegen zumeist in den hohen Herstellungs- und Aufarbeitungskosten der Mikroalgenbiomasse. Speziell die Ernte aus der wässrigen Kultursuspension, die Entwässerung der Biomasse, der Zellaufschluss der Mikroalgenzellen und die Extraktion der intrazellulär angereicherten Produkte sind verantwortlich für die hohen Kosten (Boer et al. 2012; Fon Sing et al. 2013) und machen bis zu 80 % der Gesamtprozesskosten aus (Acién et al. 2012). Für eine industrielle Nutzung von Mikroalgen zur Herstellung von niedrigpreisigen Produkten wie Lipiden oder Polysacchariden, welche zur Erzeugung von Kraftstoffen oder biologisch abbaubaren Kunststoffen eingesetzt werden können, müssen die Produktionskosten der Mikroalgen drastisch gesenkt werden (Guldhe et al. 2014).

Eine Möglichkeit zur Reduzierung der Kosten für die Aufarbeitung und zur Verbesserung der Ökonomie ist die Nutzung von Mikroalgenarten, welche das Zielprodukt aktiv aus der Zelle ausschleusen und in das umgebende Medium sekretieren oder in einer extrazellulären Matrix um die Zelle herum anlagern (Frenz et al. 1989; Hejazi and Wijffels 2004; Moheimani et al. 2014). Hierbei können die Schritte der Ernte, der Trocknung und des Zellaufschlusses der herkömmlich verwendeten Prozesskette der Aufarbeitung (Kultivierung, Ernte, Trocknung, Zellaufschluss und Produktextraktion) vermieden werden (Abbildung 1-1). Bei dem Verfahren der *in situ*-Extraktion (Milking) soll das Zielprodukt aus der Kultursuspension mit Hilfe von

geeigneten Lösungsmitteln extrahiert werden, anstatt die Mikroalgen an einen bestimmten Punkt des Wachstums zu ernten, zu trocknen und dann erst das Zielprodukt zu extrahieren (Moheimani et al. 2014). Ziel ist es, dass die Mikroalgenzellen möglichst lange vital bleiben und mit der gleichen Kultur den Prozess der *in situ*-Extraktion über eine bestimmte Zeit mehrfach zu wiederholen. So wird einerseits stetig neue Biomasse aufgebaut und andererseits kontinuierlich Produkt gewonnen. Es braucht nicht mit der Wiederanzucht einer neuen Mikroalgenkultur begonnen werden.

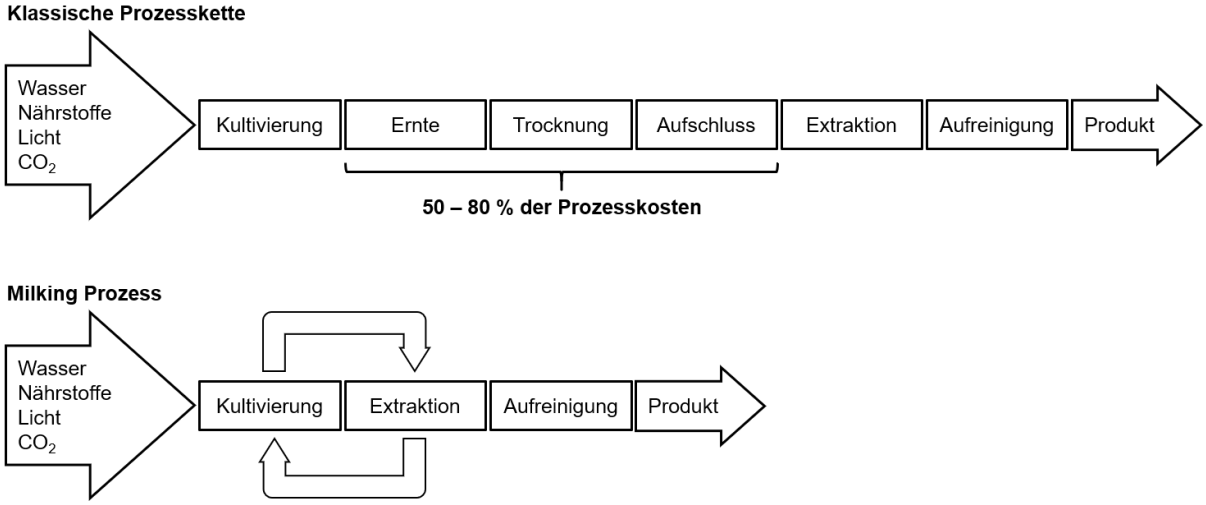


Abbildung 1-1: Klassische Prozessschritte zur Gewinnung von Produkten aus Mikroalgen im Vergleich zu dem Verfahren der *in situ*-Extraktion (Milking).

Die Grünalge *Botryococcus braunii* ist ein geeigneter Kandidat für das Verfahren der *in situ*-Extraktion, da diese Alge in der Lage ist, langkettige Kohlenwasserstoffe (C_{18} bis C_{40}) intrazellulär zu bilden, aktiv aus der Zelle zu schleusen und in einer extrazellulären Matrix um die Zellen herum einzulagern (Weiss et al. 2012). Auf Grund des hohen Anteils an gebildeten Kohlenwasserstoffen (bis zu 86 % der Biotrockenmasse) und deren Potential für Biokraftstoffe beschäftigen sich die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der *in situ*-Extraktion zumeist mit der Mikroalge *Botryococcus braunii* und der Gewinnung der durch diese Alge ausgeschleusten langkettigen Kohlwasserstoffe (Chaudry et al. 2018; Griehl et al. 2015; Hejazi and Wijffels 2004; Jackson et al. 2017; Moheimani et al. 2014). Durch die Mikroalge *Botryococcus braunii* besteht somit die Möglichkeit, langkettige Kohlenwasserstoffe direkt während der Kultivierung abzutrennen und den Gesamtprozess der Produktgewinnung aus Mikroalgen durch Einsparung kostenintensiver Arbeitsschritte ökonomischer zu gestalten.

1.2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von *Botryococcus braunii* hinsichtlich der Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe, der Auswahl geeigneter Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion und der Anwendung und Optimierung dieses Verfahrens anhand ausgewählter Stämme. Der Fokus liegt dabei auf dem Mechanismus der Produktsekretion, auf dem phylogenetischen Zusammenhang der unterschiedlichen Races sowie auf der Beeinflussung und Optimierung der Abtrennung der sekretierten langkettigen Kohlenwasserstoffe über das Verfahren der *in situ*-Extraktion. Thematisch lässt sich diese Arbeit in sieben Bereiche unterteilen:

1. Phylogenetische Analyse ausgewählter *Botryococcus braunii* Stämme basierend auf den Sequenzen der Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Regionen
2. Identifizierung und Untersuchung geeigneter *Botryococcus braunii* Stämme bezüglich der Sekretion von langkettigen Kohlenwasserstoffen für das Verfahren der *in situ*-Extraktion
3. Mikroskopische Untersuchung der Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe ausgewählter *Botryococcus braunii* Stämme
4. *In situ*-Extraktion der langkettigen Kohlenwasserstoffe aus der Kultursuspension ausgewählter *Botryococcus braunii* Stämme unter Optimierung der Extraktionsbedingungen
5. Überführung der Kultivierung und der *in situ*-Extraktion vom Labor in den nächstgrößeren Kultivierungsmaßstab
6. Optimierung des Wachstums und der Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe ausgewählter *Botryococcus braunii* Stämme
7. Zusammenführen aller Ergebnisse aus Kultivierungs- und Extraktionsoptimierung unter Durchführung einer Langzeit-*in situ*-Extraktion

Diese Arbeit soll grundlegende Einflussgrößen auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* identifizieren und über deren Optimierung einen Weg bereiten, nachhaltig erzeugte Biomoleküle für die Herstellung von für den Menschen nützlicher Produkte zur Verfügung zu stellen. Es soll ein neuer Ansatz zur Verbesserung der Ökonomie und damit eine mögliche Alternative zu den Produkten aus fossilen Rohstoffquellen geschaffen werden.

2 Grundlagen und Stand der Wissenschaft

2.1 Status quo der Algenbiotechnologie

Für den Beitrag zur Lösung globaler Probleme im 21. Jahrhundert, welche mit der stetig steigenden Weltbevölkerung einhergehen, wird das Gebiet der Algenbiotechnologie als sehr vielversprechend erachtet (Deviram et al. 2020). Die steigende Konzentration an Kohlenstoffdioxid in der Atmosphäre um 30 % seit 1950 und der damit verbundene Anstieg der globalen Oberflächentemperatur auf der Erde um 0,8 °C bis 1,1 °C seit der industriellen Revolution (Al-Ghussain 2019; NOAA 2021) stellen nur zwei Probleme dar, welche durch das Verbrennen fossiler Rohstoffe zur Intensivierung extremer Wetterphänomene beitragen (Dosio et al. 2018). Mikroalgen können aufgrund zahlreicher Vorteile gegenüber höheren Pflanzen (Deviram et al. 2020; Griehl and Bieler 2011; Rosello Sastre and Posten 2010) eine Schlüsselrolle für zukünftige Strategien zur Reduktion der Emission an Kohlenstoffdioxid, der Aufbereitung von Abwässern, aber auch zur Versorgung der Gesundheits-, Nahrungsmittel-, Aquakultur-, Kosmetik- und Pharmaindustrie mit wertvollen, biologischen, ökologischen und nicht-fossilen Substanzen darstellen (Borowitzka 2013; Borowitzka and Moheimani 2013).

Die erste Nutzung von Mikroalgen bzw. Cyanobakterien lässt sich über 2000 Jahre nach China zurückdatieren, als das Cyanobakterium *Nostoc* zum Überleben während Hungersnöten als Nahrungsmittel genutzt wurde (Avagyan 2010). Bereits 900 n. Chr. wurde durch die Kanembu aus dem Tschadsee und 1300 n. Chr. durch die Azteken aus dem heutigen Texcoco-See das Cyanobakterium *Arthrospira* (*Spirulina*) als Nahrungsmittel gewonnen (Abdulqader et al. 2000). Einhergehend mit der Entwicklung von technischen Produktionsanlagen (offenen bzw. geschlossenen Kultivierungssystemen) sowie der Anwendung photoautotropher und heterotropher Produktionsstrategien hat sich die Nutzung von Mikroalgen enorm gesteigert (Fernández et al. 2021).

Die weltweiten Produktionsmengen von Algenbiomasse lagen mit Stand 2019 bei ca. 30.000 t für photoautotroph erzeugte Biomasse bei einem Umsatz von ca. 700 Mio. USD pro Jahr (Hallmann and Rampelotto 2019). Im Jahr 2017 gab es global betrachtet ca. 70 Produzenten, welche in einem Maßstab von mindestens 1 ha Fläche in Open Ponds bzw. 10 m³ Reaktorvolumen in geschlossenen Photobioreaktoren Mikroalgen produzierten (Olaizola and Grewe 2019). Unabhängig vom Kultivierungsvolumen gibt es in Europa aktuell über 160 Unternehmen, welche Mikroalgen und über 220 Unternehmen, welche *Spirulina* produzieren. Die produzierten Mengen werden dabei auf ca. 185 t a^{-1} trockene Biomasse geschätzt (Araújo et al. 2021). Der Großteil der erzeugten Biomasse wird aufgrund der niedrigen Investitions- und Betriebskosten in offenen Kultivierungssystemen (Open Ponds) gewonnen (Fernández et al. 2021).

Global wird vorrangig *Arthrospira* (18.000 t a^{-1}), *Chlorella* (9.500 t a^{-1}), *Dunaliella* (1.700 t a^{-1}), *Haematococcus* (300 t a^{-1}), *Nannochloropsis* (150 t a^{-1}) und *Euglena* (50 t a^{-1}) mit Handelspreisen zwischen 13 und 120 USD kg^{-1} produziert (Olaizola and Grewe 2019). Die erzeugte Biomasse wird einerseits als Rohbiomasse in Form von Algenslurry (frisch bzw. tiefgefroren) bzw. in getrockneter Form (Pulver bzw. Tabletten) und anderseits in Form von gezielt extrahierten Wert- und Wirkstoffen vertrieben (Borowitzka 2018a). Die Anwendungsfelder der erzeugten Biomasse liegen im Wesentlichen in der stofflichen Nutzung als Rohstoff für die Lebensmittel- und Futtermittelindustrie sowie für Fein- und Bulkchemikalien im Bereich der Kosmetikindustrie (Borowitzka 2013; Borowitzka 2018a; Borowitzka and Moheimani 2013). Die Applikation von Mikroalgen oder Mikroalgeninhaltsstoffen für Pharmaka findet zum Großteil und mit zunehmender Bedeutung auf dem Gebiet der Forschung und Entwicklung statt. Mit wenigen Ausnahmen wie die Zytostatika Adcetris®, PADCEV®, Polivy® Blenrep®, Gaviscon Dual® gegen Sodbrennen oder Algovir® als Virostatikum befinden sich mikroalgenbasierte Pharmaka noch in klinischen Studien (Stand 11/2020: 5 Phase I; 9 Phase II; 0 Phase III) (Griehl 2021; Rosales-Mendoza et al. 2020).

Neben der Verwendung der Rohbiomasse im Nahrungs- und Futtermittelbereich sind Hochwertprodukte aus der Biomasse von Mikroalgen von großer Relevanz (Borowitzka 2013). Vor allem Carotinoide, Phycobiliproteine und mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind von großer Bedeutung (Borowitzka 2013; Borowitzka 2018a). Für den Bereich der Carotinoide und Biofarbstoffe begründet sich die Relevanz in der steigenden Nachfrage nach Produkten natürlichen Ursprungs (Osório et al. 2020). Die Produktion von *β*-Carotin aus *Dunaliella salina* stellt die erste kommerzielle Herstellung eines Hochwertproduktes aus Mikroalgen dar und wird bereits seit 1980 im industriellen Maßstab umgesetzt (Borowitzka 2013). Anwendung findet *β*-Carotin (E 160a) als Farbstoff im Lebens- und Futtermittelbereich, wobei der Anteil an *β*-Carotin aus *Dunaliella salina* ca. 38 % (Borowitzka 2013) ausmacht. Astaxanthin wird hauptsächlich zu färbenden Zwecken im Fischfutter eingesetzt und kann mit Hilfe der Alge *Haematococcus pluvialis* produziert werden (Borowitzka 2013; Panis and Carreon 2016). Die weltweite Produktion an Astaxanthin betrug 2014 ca. 300 t (25 t aus natürlichen Quellen), wobei ca. 3 t aus Mikroalgen hergestellt wurden (Panis and Carreon 2016). Als blauer Lebensmittelfarbstoff findet das Phycobiliprotein Phycocyanin (E140/E141) Einsatz und wird vorrangig aus den Cyanobakterien *Arthrospira platensis* und *Arthrospira maxima* gewonnen (Borowitzka 2013; Carle and Schweiggert 2016). Als weitere Hochwertprodukte aus Mikroalgen gelten die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), welche vornehmend in der Aquakultur Anwendung finden (Borowitzka 2013). Diese werden mit einem Produktionsvolumen von ca. 45.000 t Biomasse

pro Jahr zum Großteil heterotroph aus *Ulkenia*, *Schizochytrium* und *Crypthecodinium* hergestellt (Olaizola and Grewe 2019).

Neben den Absatzmärkten der vorangegangen Mikroalgen und Produkte werden eine Vielzahl an Mikroalgen und Substanzen im Kosmetik- und Aquakulturbereich verwendet. Für Kosmetika im Gesichts- und Hautpflegebereich sind hauptsächlich Polysaccharide aus Mikroalgen interessant (Borowitzka 2013). Im Aquakulturbereich werden verschiedene Mikroalgen als Ersatz für Fischmehl und Fischöl für die Aufzucht von Fischen in Form von Lebendkulturen, teilweise aber auch Biomasse in getrockneter Form eingesetzt (Catarina and Xavier 2012; Shah et al. 2018). Neben *Chlorella* werden *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* oder auch *Tetraselmis* für den Einsatz in der Aquakultur genutzt (Enzing et al. 2014; Posten and Feng Chen 2016).

Parallel zu den vorher beschrieben Anwendungsfeldern wird ein großes Potential der Algenbiotechnologie im Bereich der energetischen Nutzung gesehen (Borowitzka and Moheimani 2013). Aufgrund der Eigenschaft, dass Mikroalgen einen hohen Anteil der Biomasse in Form von Lipiden bilden können, werden diese als attraktive Quelle für die Herstellung von Biodiesel gesehen (Borowitzka 2018a). Neben der Gewinnung von Biodiesel können Mikroalgen aufgrund der Einlagerung von Kohlenhydraten fermentativ auch zu Ethanol oder über Vergasung, Pyrolyse, thermochemische Verflüssigung, direkte Verbrennung oder anaerobe Vergärung in andere Formen von Bioenergieträgern umgewandelt werden (Borowitzka and Moheimani 2013). Trotz des Potentials der Mikroalgen als Quelle erneuerbarer Energieträger ergab ein Großteil der Studien auf diesem Gebiet keinen Prozess mit positiver Energiebilanz (Borowitzka and Moheimani 2013; Fon Sing et al. 2013; Li et al. 2008; Veeramuthu and Ngamcharussrivichai 2021). Die Gründe für die mangelnde Rentabilität sind unter anderem auf die zu hohen Herstellungskosten zurückzuführen (Borowitzka 2018a; Borowitzka and Moheimani 2013; Veeramuthu and Ngamcharussrivichai 2021).

Die aktuellen Herausforderungen der Algenbiotechnologie beziehen sich neben den Hürden des Markteintritts im Bereich der Lebensmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie durch gesetzliche Regularien (Novoveská et al. 2019), auf die Reduzierung der Produktionskosten (Kultivierung, Aufarbeitung und Gewinnung der Wertprodukte), auf den Bau von großvolumigen Demonstrationsanlagen sowie auf die Intensivierung der Zusammenarbeit von Forschung und Industrie (Bippes et al. 2016).

2.2 Extrazelluläre Verbindungen in Mikroalgen

Einen Ansatz zur Reduzierung der Kosten für die Gewinnung von Wertstoffen aus Mikroalgen stellt die gezielte Nutzung von extrazellulären Verbindungen der Mikroalgen dar. Diese extrazellulären Verbindungen können dabei direkt aus dem Kulturmedium unter Nutzung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion (Abschnitt 2.4 „Milking (*in situ*-Extraktion) von Mikroalgen“) abgetrennt werden, was die kosten- und energieintensiven Schritte der Ernte, der Trocknung und des Zellaufschlusses der Biomasse einspart (Griehl et al. 2015).

Extrazelluläre Substanzen werden von einer Vielzahl an Mikroalgen aufgrund deren Bestreben zur Bildung von polymikrobiellen Gemeinschaften (Kolonien, Flocken, Biofilme oder Schlämme) gebildet (Xiao and Zheng 2016). Diese aktiv sekretierten Verbindungen bestehen meistens aus einer Mischung von strukturell und in der Zusammensetzung sehr diversen, hochmolekularen Biopolymeren und beinhalten unter anderem Polysaccharide, Proteine (Enzyme und strukturelle Proteine), DNA, Lipide und Carotinoide (Decho and Gutierrez 2017). Diese extrazellulären Substanzen haben einen wesentlichen Einfluss auf die physiologischen und chemischen Eigenschaften, wie die Oberflächenladung, Viskosität, Flockenbildung, Struktur und Sinkgeschwindigkeit der Organismen (Borowitzka et al. 2016; Schriber and Venable 2019; Xiao and Zheng 2016). Die Menge und die spezielle Zusammensetzung der sekretierten Substanzen bei Mikroalgen werden dabei von zahlreichen Faktoren, wie der Spezies, dem Stamm, dem Nährstoffangebot, den Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Scherrate oder Salinität), der Physiologie und dem Alter der Kultur bestimmt (Borowitzka et al. 2016; Liu et al. 2016; Schriber and Venable 2019; Xiao and Zheng 2016). Potenzielle Anwendungsfelder der extrazellulären Verbindungen werden aufgrund antiadhäsiver, antibakterieller, immunregulatorischer, emulgierender und bioaktiver Eigenschaften im Bereich der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie gesehen. Darüber hinaus sind diese Verbindungen aufgrund koagulierender und metallbindender Wirkung auch im Bereich der Abwasserbehandlung und der Bodensanierung von großem Interesse (Liu et al. 2016; Xiao and Zheng 2016).

2.2.1 Extrazelluläre Polysaccharide (EPS)

Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) stellen eine Gruppe von Biopolymeren mit hohem Molekulargewicht dar und werden von Mikroorganismen inklusive Mikroalgen während des Wachstums oder der Vermehrung gebildet (Delbarre-Ladrat et al. 2014; Xiao and Zheng 2016). EPS können in Mikroalgen und Cyanobakterien als enganliegender Mantel in Form einer dünnen Schicht auf der Zellwand oder äußeren Zellmembran, als die Zellen umschließende Kapseln, Fibrillen oder in loser Form um die Zellen herum als Schleim

vorkommen (Rossi and Philippis 2016) und in das umgebende Medium abgegeben werden (Ruas-Madiedo et al. 2002). Viele Mikroalgen, speziell Rotalgen und Cyanobakterien produzieren eine Vielzahl von strukturell sehr unterschiedlichen EPS, welche die Zellen vor Umweltstress schützen und bei Zellinteraktionen, der Anhaftung und Biofilmbildung eine entscheidende Rolle spielen (Liu et al. 2016; Rossi and Philippis 2016; Xiao and Zheng 2016). Die Zusammensetzung der durch die Mikroalgen und Cyanobakterien gebildeten EPS ist zumeist sehr komplex und von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich. Für einige Rotalgen und Diatomeen wurden Polymere festgestellt, welche aus acht bis zehn unterschiedlichen Monomeren aufgebaut sind (Rossi and Philippis 2016). In vielen Mikroalgen wurden unter anderem Glucose, Galactose und Fucose sowie in manchen Fällen Rhamnose und Arabinose und in einigen Cyanobakterien auch Fructose als monomere Bausteine der gebildeten EPS detektiert (Rossi and Philippis 2016). Neben diesen Hauptmonomeren konnten in geringeren Mengen bei einigen Stämmen unter anderem Xylose, Glucuronsäure sowie Zucker mit methylierten und sulfatierten Seitenketten detektiert werden (Liu et al. 2016; Rossi and Philippis 2016; Xiao and Zheng 2016).

Die chemische Zusammensetzung der EPS von über 200 Cyanobakterien, Diatomeen, Grünalgen und Rotalgen wurde von Rossi and Philippis 2016 in einer umfangreichen Tabelle zusammengetragen. Die Bildung und die Zusammensetzung der stammspezifischen EPS kann dabei sehr stark von den jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen, wie der Intensität und der spektralen Qualität des Lichtes, der Salinität, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel, als auch durch biotischen und abiotischen Stress beeinflusst werden (Rossi and Philippis 2016).

Die Synthese der Bausteine der sekretierten EPS erfolgt in Mikroalgen (Chloroplasten) und Cyanobakterien (Cytosol) zunächst in gleicher Weise durch die Bildung von Kohlenhydraten über den Calvin-Zyklus (Rossi and Philippis 2016). Die Synthese sowie die Sulfatierung der Polysaccharide findet in Mikroalgen über den Golgi-Apparat statt. Anschließend werden diese in Vesikeln verpackt und fusionieren im weiteren Verlauf mit der Plasmamembran (Rossi and Philippis 2016). Der Aufbau der gebildeten Polysaccharide steht dabei in engem Zusammenhang mit dem Zellzyklus. Die Formation und Polymerisation der EPS in Mikroalgen findet während der Lichtphase statt, wobei im zeitlichen Verlauf dieser Phase die Anbindung weiterer Zucker ausgehend von Glucose über Galactose, Mannose, Glucuronsäure, Ribulose und methylierten Zuckern erfolgt (Rossi and Philippis 2016). Polysaccharidfraktionen mit einer Molekülmasse kleiner 500 kDa werden dabei innerhalb der Zelle und größere Fraktionen außerhalb der Zelle polymerisiert (Rossi and Philippis 2016). Im Vergleich zu Mikroalgen ist der Stoffwechselweg für die Synthese der EPS in Cyanobakterien wesentlich komplexer aufgebaut und noch nicht vollständig erforscht (Rossi and Philippis 2016). Es wird

angenommen, dass die Aktivierung und Umwandlung der Monosaccharide im Cytoplasma der Zellen stattfinden. Die Polymerisation erfolgt laut Annahme im periplasmatischen Raum an der Seite der Plasmamembran, gefolgt von einem Export des Polymers durch die äußere Membran (Pereira et al. 2009). Die Bildung der stammspezifischen extrazellulären Strukturen wie Zellmantel, Kapseln und Schleim ist sowohl für Mikroalgen als auch für Cyanobakterien weitestgehend ungeklärt. Über Untersuchung der involvierten Enzyme/Gene wird versucht, die Synthesemechanismen dieser Strukturen aufzuklären (Rossi and Philippis 2016).

Tabelle 2-1: Biologische Aktivität und Anwendungen einiger durch Mikroalgen und Cyanobakterien produzierten extrazellulären Polysaccharide. Daten aus Liu et al. 2016 und Xiao and Zheng 2016 zusammengeführt.

Mikroalge	Bioaktive Wirkung/Anwendung	Quelle
Anabaena spiroides	metallbindend, antithrombogen, antiatherogen, gerinnungshemmend, antibakteriell, antioxidativ	Freire-Nordi et al. 2005
Arthrospira platensis	antiviral, antibakteriell, antioxidativ	Challouf et al. 2011
Chlorella stigmatophora	metallbindend	Kaplan et al. 1987
Chlorella vulgaris	antibakteriell	Xiao and Zheng 2016
Dunaliella salina	antiallergen, antiinflammatorisch	Borowitzka 1995
Gyrodinium impudicum	antiviral	Keith et al. 2008
Nostoc flagelliforme	emulgierend, koagulierend	Han et al. 2014
Nostoc linckia	metallbindend	Mona and Kaushik 2015
Phaeodactylum tricornutum	antiviral, antiadhäsiv, antiinflammatorisch, radikalbindend	Guzmán et al. 2003
Porphyridium cruentum	antiviral, antibakteriell, immunmodulierend, antikanzerogen	Dvir et al. 2000 Sun et al. 2012
Porphyridium sp.	antiviral, antioxidativ, antiinflammatorisch, viskositätssteigernd	Dvir et al. 2000 Dvir et al. 2009
Rhodella reticulata	antioxidativ	Chen et al. 2010a
Scenedesmus obliquus	antifungal	Xiao and Zheng 2016

Aus anwendungsorientierter Sicht sind die durch Mikroalgen und Cyanobakterien sekretierten EPS vor allem im Bereich der Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie von großem Interesse, da diese wie durch Xiao and Zheng 2016 und Liu et al. 2016 zusammengefasst, eine ganze Reihe bioaktiver Wirkungen aufzeigen (Tabelle 2-1). Hinsichtlich der Gewinnung und Aufarbeitung wurde basierend auf der Struktur der sekretierten EPS von Kumar et al. 2018 ein Verfahrensschema entwickelt, welches im Fall des Auftretens der EPS im Kulturmedium einen Zentrifugationsschritt der Kultursuspension mit anschließender Alkoholpräzipitation und Dialyse der im Überstand befindlichen EPS vorsieht. EPS, welche als Schleimschicht um die Zellen auftreten, müssen nach der Zentrifugation aus dem Pellet über Dispergierung

herausgelöst und anschließend ebenfalls mit Alkohol präzipitiert werden. Liegen die EPS dagegen als Hüllen oder Kapseln um die Zellen vor, muss ein Zellaufschluss mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation erfolgen, bevor die EPS über einen enzymatischen Abbau gelöst im Puffer vorliegen.

2.2.2 Extrazelluläre Proteine und Enzyme

Die von Mikroalgen sekretierten extrazellulären Verbindungen setzen sich neben Polysacchariden auch aus Proteinen zusammen, welche mit den sekretierten Polysacchariden und anderen extrazellulären Verbindungen in Interaktion stehen und damit eine stabile Struktur der sekretierten extrazellulären Matrix bilden (Flemming and Wingender 2010; Xiao and Zheng 2016). Die durch Mikroalgen ausgeschleusten Proteine in Form von Exoenzymen und Glycoproteinen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der EPS, zur Bereitstellung von Energie und Kohlenstoff während des Lebenszyklus der sekretierenden Zellen, der chemischen Signalübertragung und der Interaktion zwischen den Zellen über das Anhaften und Ablösen von Oberflächen oder anderen Zellen (Flemming and Wingender 2010; Liu et al. 2016; Xiao and Zheng 2016). Neben Exoenzymen und Glycoproteinen konnten in den extrazellulären Verbindungen von Mikroalgen unter anderem auch Lektine, Amyloide, Proteaseinhibitoren und Phycoerythrin-ähnliche Proteine nachgewiesen werden (Flemming and Wingender 2010; Liu et al. 2016; Xiao and Zheng 2016).

Über die genaue Zusammensetzung, Struktur und Funktion der sekretierten Proteine und Enzyme von Mikroalgen ist zum aktuellen Zeitpunkt sehr wenig bekannt. Wie bei den EPS ist die Zusammensetzung und die Funktion der sekretierten Proteine und Enzyme stammspezifisch und wird durch die vorherrschenden Umweltbedingungen beeinflusst (Xiao and Zheng 2016). Xiao and Zheng 2016 haben einige in Grünalgen, Diatomeen und Rotalgen vorkommende extrazelluläre Proteine und deren Konzentration im Kulturmedium oder als Anteil der sekretierten Substanzen zusammengefasst. In den durch Grünalgen sekretierten Substanzen können dabei häufig Proteine mit einem Anteil von 13 % (*Dunaliella tertiolecta*) bis zu 35 % (*Chlorella vulgaris*) der sekretierten Verbindungen nachgewiesen werden, wohingegen der Proteinanteil der durch Diatomeen sekretierten Substanzen maximal 10 % und bei Rotalgen deutlich unter 10 % beträgt (Xiao and Zheng 2016). Die biologische Funktion sowie die potentielle Anwendung einiger aus Mikroalgen sekretierter Proteine und Enzyme ist zusammenfassend aus den Veröffentlichungen von Liu et al. 2016 und Xiao and Zheng 2016 in Tabelle 2-2 dargestellt.

Zur Herstellung von Biopharmaka rückt die rekombinante Produktion von Proteinen in Mikroalgen aufgrund der stetigen Verbesserungen der Technologien des *Genetic Engineering* immer weiter in den Fokus (Barolo et al. 2020). Mit Hilfe der Algen *Chlamydomonas*, *Chlorella*,

Dunaliella, *Porphyridium* und *Nannochloropsis* konnten bereits über 40 verschiedene Proteine in Form von monoklonalen Antikörpern, Hormonen und Enzymen rekombinant synthetisiert und einige davon durch das Anfügen von speziellen Signalpeptiden zur aktiven Sekretion aus den Zellen veranlasst werden (Barolo et al. 2020).

Tabelle 2-2: Von Mikroalgen sekretierte Proteine und Enzyme, deren biologische Funktion und potenzielle Anwendung. Daten aus Liu et al. 2016 und Xiao and Zheng 2016 zusammengeführt.

Protein/Enzym - **Alge**	**Biologische Bedeutung/Anwendung**	**Quelle**
Carboanhydrasen - Grünalgen - Diatomeen - Dinoflagellaten - Haptophyten	Extrazelluläre Carboanhydrasen werden von vielen Mikroalgen gebildet, katalysieren unter anderem die Dehydratisierung von HCO_3^- zu CO_2 und spielen eine wichtige Rolle bei der Versorgung mit CO_2 und der Regulierung des pH-Wertes.	Dudoladova et al. 2007 Hopkinson et al. 2013
Proteasen - *Chlamydomonas* - *Dunaliella* - *Chlorella* - *Chaetoceros*	Extrazelluläre Proteasen konnten bei einigen Mikroalgen im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Bakterien und der Erhöhung der Resistenz gegenüber diesen nachgewiesen werden. Proteasen sind unter anderem an der Regulierung von viralen Lebenszyklen beteiligt und werden somit als mögliche Zielsubstanz für die Entwicklung von Medikamenten gesehen.	Kellam and Walker 1987 Paul and Pohnert 2013
Phenoloxidasen - *Chlamydomonas* - *Chlorella* - *Scenedesmus* - *Anabaena*	Phenole sind aufgrund ihrer Toxizität und Beständigkeit eine wichtige Gruppe von Exotoxinen. Einige Mikroalgen sind in der Lage Pentachlorphenol, Nitrophenol und Naphthalinsulfonsäure abzubauen. Die bei der Oxidation involvierten extrazellulären Phenoloxidasen können potenziell zum Abbau phenolischer Umweltverschmutzungen genutzt werden.	Grandgirard et al. 2002 Zhang et al. 2008
Protease-Inhibitoren - *Chlorella*	Aus Algen isolierte Cysteinprotease-Inhibitoren haben hemmende Effekte gegen Papain, Ficain und Chymopapain. Diese Inhibitor-Proteine werden von den Zellen zum Schutz vor Viren und anderen Fressfeinden synthetisiert. Diese Substanzen sind im Bereich der Medikamentenentwicklung zur Behandlung von beispielsweise Lungenemphysemen von sehr großem Interesse.	Ishihara et al. 2006
Phycoerythrin-ähnliche Proteine - *Oscillatoria* - *Scytonema*	Phycobiliproteine werden intrazellulär gebildet und als Fluoreszenzmarker, Lebensmittelfarbstoff und für Kosmetika eingesetzt. Einige Stämme sekretieren Phycoerythrin-ähnliche Proteine, welche als potenzielle Algizide gegen andere Algenarten fungieren.	Karseno et al. 2009

2.2.3 Extrazelluläre Lipide

Die Gewinnung extrazellulärer Lipide aus Mikroalgen als Ersatz für fossile Brennstoffe und zur Reduzierung der Aufarbeitungskosten wird als ein vielversprechender Ansatz zur Herstellung niedrigpreisiger Produkte aus Algen gesehen (Liu et al. 2016). Eine der am häufigsten beschriebenen Mikroalgen auf dem Gebiet der Sekretion von Lipiden stellt die Grünalge *Botryococcus braunii* dar. *Botryococcus braunii* produziert langkettige Kohlenwasserstoffe bis

zu einem Massenanteil von 86% der Biomasse und lagert diese in einer extrazellulären Matrix um die Zellen ein (Borowitzka 2018b). Die Charakterisierung dieser Alge sowie die Mechanismen zur Synthese und Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe durch *Botryococcus braunii* sind im nachfolgenden Abschnitt 2.3 im Detail dargestellt. Neben den langkettigen Kohlenwasserstoffen von *Botryococcus braunii* konnten extrazelluläre Lipide in Form von freien Fettsäuren auch bei den Mikroalgen *Ochromonas danica*, *Tetraselmis viridis*, *Nephrochloris salina*, *Chlorella minutissima* und *Scenedesmus* sp. detektiert und extrahiert werden (Abomohra et al. 2014; Kambourova et al. 2004; Kind et al. 2012; Tambiev et al. 1989). Beispielsweise konnten bei der Chrysophyta *Ochromonas danica* mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (C18:2*n*-6), *α*-Linolensäure (C18:3*n*-3) und Arachidonsäure (C20:4*n*-6) mit Konzentrationen zwischen 20 und 51 mg g_X^{-1} im Kulturmedium nachgewiesen werden (Abomohra et al. 2014). Bei den Algen *Tetraselmis viridis* und *Nephrochloris salina* konnte neben freien Fettsäuren auch polare Lipide, Sterole und Triacylglycerole im Kulturmedium identifiziert werden (Tambiev et al. 1989).

Analog zu den extrazellulären Proteinen rückt die Aufklärung der Mechanismen zur Lipidsekretion sowie die rekombinante Implementierung der zur Bildung und Sekretion von Lipiden zugrundeliegenden Stoffwechselkaskaden in anderen Mikroalgen in den Fokus der Forschung (Sproles et al. 2021). Beispielsweise konnten für einige Stämme der Mikroalge *Nannochloropsis* Transkriptionsfaktoren ermittelt werden, welche in die Regulierung der Lipidsynthese involviert sind. Durch deren Beeinflussung konnte im Vergleich zu den Zellen des Wildtyps eine um das 16-fache erhöhte Lipidbildung und Lipidsekretion erzielt werden (Li et al. 2019; Sproles et al. 2021).

2.2.4 Extrazelluläre organische Säuren, Phytohormone und allelopathische Substanzen

Neben Polysacchariden, Proteinen und Lipiden im Allgemeinen produzieren Mikroalgen eine Vielzahl anderer extrazellulärer Verbindungen wie Phytohormone, organische Säuren und allelopathische Substanzen, welche eine Rolle beim Wachstum, der Zellinteraktion und bei der Abwehr von Fraßfeinden spielen (Liu et al. 2016). Phytohormone stellen dabei eine Gruppe von Signalmolekülen dar und spielen eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Stressantwort bei Pflanzen (Hirsch et al. 1997). In den Kultursuspensionen der Mikroalgen *Chlorella vulgaris*, *Stichococcus bacillaris*, *Nostoc muscorum*, *Trichormus versicolor* und *Synechococcus leopoliensis* konnte das Phytohormon Abscisinsäure, welches die Interaktion mit anderen Organismen beeinflusst, mit einer Konzentration von 1 µg L^{-1} als Stressantwort auf eine erhöhte Salzkonzentration im Medium nachgewiesen werden (Maršálek et al. 1992a, 1992b). Das Phytohormon Indol-3-essigsäure, welches die Zellteilung fördert und eines der

physiologisch aktivsten Auxine darstellt, konnte in niedrigen Konzentration im Kulturmedium der Mikroalgen *Scenedesmus armatus*, *Chlorella minutissima* und *Chlorella pyrenoidosa* unter Ausschluss von Licht und Zugabe von Glucose gemessen werden (Mazur et al. 2001; Stirk et al. 2014). Darüber hinaus konnten Pichler et al. 2020 unter anderem die Sekretion der Phythormone Abscisinsäure, Indol-3-essigsäure und Jasmonsäure in verschiedenen terrestrisch wachsenden Trebouxiophyceae als Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen wie einsetzende Trockenheit beobachten. Aus anwendungsorientierter Sicht bietet der gezielte Einsatz und die Steuerung der extrazellulären Konzentration von Phytohormonen eine Möglichkeit, das Wachstum sowie die Akkumulation an Lipiden und anderen Metaboliten zu regulieren und damit verbunden, die Produktion von Mikroalgen zu verbessern (Stirk and van Staden 2020). Einige organische Säuren, wie beispielsweise L-Ascorbinsäure, Milchsäure, Aminolävulinsäure und Glycolsäure werden ebenfalls durch Mikroalgen gebildet und in das umliegende Kulturmedium sekretiert. Die biologische Bedeutung, die potentielle Anwendung und die sekretierenden Algenstämme sind zusammenfassend aus der Veröffentlichung von Liu et al. 2016 in Tabelle 2-3 dargestellt. Neben Phytohormonen und organischen Säuren werden allelopathische Substanzen in Form von Phytotoxinen von fast allen Mikroalgenklassen gebildet. Eine Zusammenfassung von durch Mikroalgen sekretierten Phytotoxinen in Form von Fettsäuren, mehrfach ungesättigten Aldehyden, Alkaloiden und Peptiden, deren physiologische Effekte, Zielorganismus und potentielle biotechnologische Anwendung wurde durch Liu et al. 2016 veröffentlicht.

Tabelle 2-3: Extrazelluläre organische Säuren in Mikroalgen. Daten entnommen aus Liu et al. 2016.

Org. Säure	Biologische Bedeutung/Anwendung	Stämme	Quelle
L-Ascorbinsäure	Essenzielles Vitamin in der menschlichen Ernährung. Sekretion von acidophilen Mikroalgenarten unter aeroben Bedingungen.	*Prototheca* sp.	Running et al. 2002
Milchsäure	Wichtige Verbindung in der Lebensmittel-, Pharma-, Textilindustrie. Herstellung von Biokunstoffen.	*N. salina* *S. incrassatulus*	Kambourova et al. 2006 Talukder et al. 2012
Aminolävulinsäure	Vorläufer von Chlorophyll, Häm, Vitamin B12. Verwendung als Insektizid und Wachstumsförderer bei Pflanzen.	*C. regularis*	Ano et al. 1999
Glycolsäure	Hauptmetabolit während Photorespiration. Ausgangsstoff in der Textil-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie.	*T. gracilis* *P. tricornutum*	Rigobello-Masini et al. 2012

Zusammenfassend bergen von Mikroalgen sekretierte Verbindungen ein großes Potential für die Algenbiotechnologie, durch deren Nutzung kostenintensive Schritte der Aufarbeitungskette eingespart werden können.

2.3 Die Grünalge *Botryococcus braunii*

Die koloniebildende Grünalge *Botryococcus braunii* wurde erstmals 1849 durch Friedrich Traugott Kützing in seinem Buch „*Species algarum*“ (Kützing 1849) erwähnt. Das Auftreten von *Botryococcus braunii* konnte in vielen klimatischen Bereichen von kontinentalen, über tropische bis hin zu alpinen Klimazonen in Frisch und Brackwasser nachgewiesen werden (Metzger et al. 1985; Metzger and Largeau 2005).

Botryococcus braunii bildet charakteristische Kolonien aus Zellen mit einer Größe von 6 bis 15 µm. Die einzelnen birnenförmigen Zellen werden stammabhängig am basalen Bereich botryoid-förmig in einer extrazellulären Matrix (Abbildung 2-1) zusammengehalten (Metzger and Largeau 2005). Diese aus langkettigen Kohlenwasserstoffen und Kohlenhydraten bestehende extrazelluläre Matrix (Weiss et al. 2012) erlaubt es der Alge, die Höhe in der Wassersäule zu regulieren, und damit verbunden, die Exposition an Sonnenstrahlung zu beeinflussen (Banerjee et al. 2002). Die einzelnen Zellen werden in der Kolonie von einer äußeren Stützwand, welche bis zu 97 % aus Polysacchariden besteht, umgeben (Weiss et al. 2012). Diese Stützwand steht in direktem Kontakt mit jeder einzelnen Zelle der Kolonie und bildet eine die ganze Kolonie umschließende Hülle, welche die Matrix zusammenhält, stabilisiert, vor Pathogenen und Fraßfeinden schützt sowie den Austausch von Nährstoffen und Interaktionen mit symbiotischen Bakterien ermöglicht (Gouveia et al. 2019; Uno et al. 2015). An diese Koloniehülle schließt sich eine faserartige Ummantelung an, welche bis ins Kulturmedium reicht. Durch den ständigen Kontakt dieser faserartigen Ummantelung mit dem umgebenden Medium kann es zu einem Herauslösen der Polysaccharide und damit einhergehend zu einer Erhöhung der Viskosität des Kulturmediums kommen (García-Cubero et al. 2018). Die Bestandteile der äußeren Wand werden über einen apikalen Golgi-Apparat im Cytoplasma gebildet und über kortikales endoplasmatisches Retikulum sekretiert (Weiss et al. 2012).

Die Zellwand der einzelnen Zellen besteht aus *β*-1,4- und *β*-1,3-Glucanen (Weiss et al. 2012) und wird von einer dünneren trilaminaren Schicht umgeben (Wolf 1983). Im Cytoplasma befinden sich der zentral gelegene Zellkern sowie Lipidkörper, welche mit Kohlenwasserstoffen gefüllt sind (Weiss et al. 2012). Wandständig, in nicht-apikaler Ausrichtung, befindet sich ein Chloroplast mit basal angeordnetem Pyrenoid (Wolf 1983). Der Raum zwischen den einzelnen Zellen ist ausgefüllt mit flüssigen sowie mit polymerisierten Kohlenwasserstoffen, wobei die flüssigen leicht durch *n*-Hexan herausgelöst werden können, die polymerisierten jedoch nicht (Weiss et al. 2012).

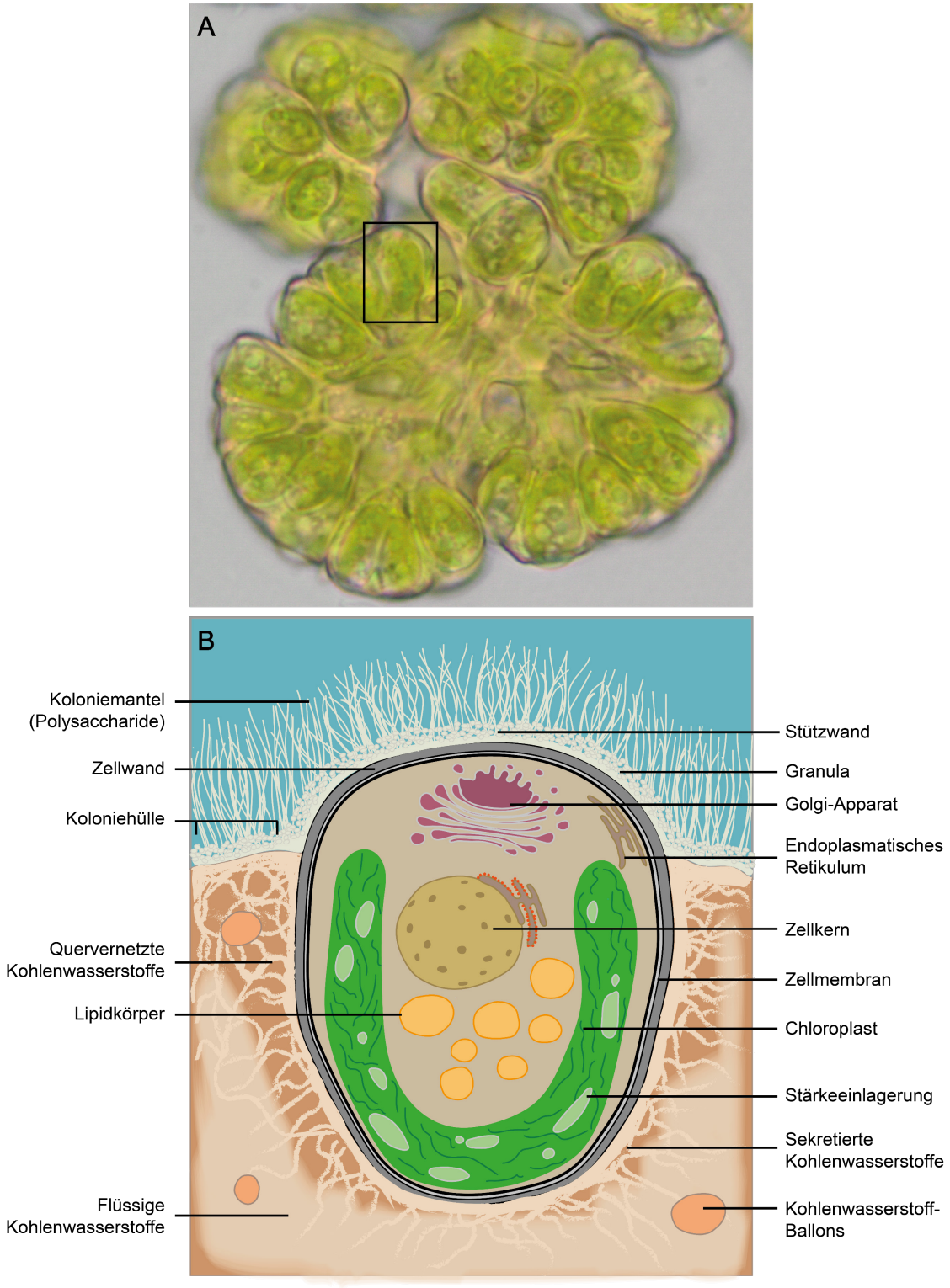


Abbildung 2-1: **Schematische Darstellung einer *Botryococcus braunii* Zelle (B) innerhalb der kolonieumgebenden extrazellulären Matrix (A). Abbildung erstellt in Adobe Illustrator nach Weiss et al. 2012.**

2.3.1 Charakterisierung der Grünalge *Botryococcus braunii*

Basierend auf der Struktur der durch den jeweiligen *Botryococcus braunii* Stamm synthetisierten Kohlenwasserstoffe lassen sich die einzelnen Stämme dieser Alge chemisch in vier sogenannte „Races“ klassifizieren (Abbildung 2-2). Die Stämme, welche der A-Race zugeordnet werden, synthetisieren von den Fettsäuren abgeleitete Alkadiene und Alkatriene mit ungeraden Kettenlängen zwischen C_{23} und C_{31} und terminaler Doppelbindung. Häufig kommen dabei zwei oder drei Doppelbindungen vor, welche cis- oder trans-isomerisiert vorliegen können (Metzger et al. 1985). Durch die Stämme der B-Race werden sogenannte „Botryococcene“ mit der spezifischen Summenformel C_nH_{2n-10} mit Kettenlängen zwischen C_{30} und C_{37}, als auch methylierte Squalene mit Kettenlängen zwischen C_{31} und C_{34} gebildet (Achitouv et al. 2004; Huang and Dale Poulter 1989). Die Stämme der L-Race synthetisieren zu hohen Anteilen das Tetraterpen Lycopadien mit der Summenformel $C_{40}H_{78}$ (Metzger et al. 1990; Metzger and Casadevall 1987). Zusätzlich zu den Races A, B und L wurde durch Kawachi et al. (2012) eine weitere, die S-Race klassifiziert. Diese bildet Epoxyalkane und gesättigte Alkane mit Kettenlängen von C_{18} und C_{20} (Kawachi et al. 2012).

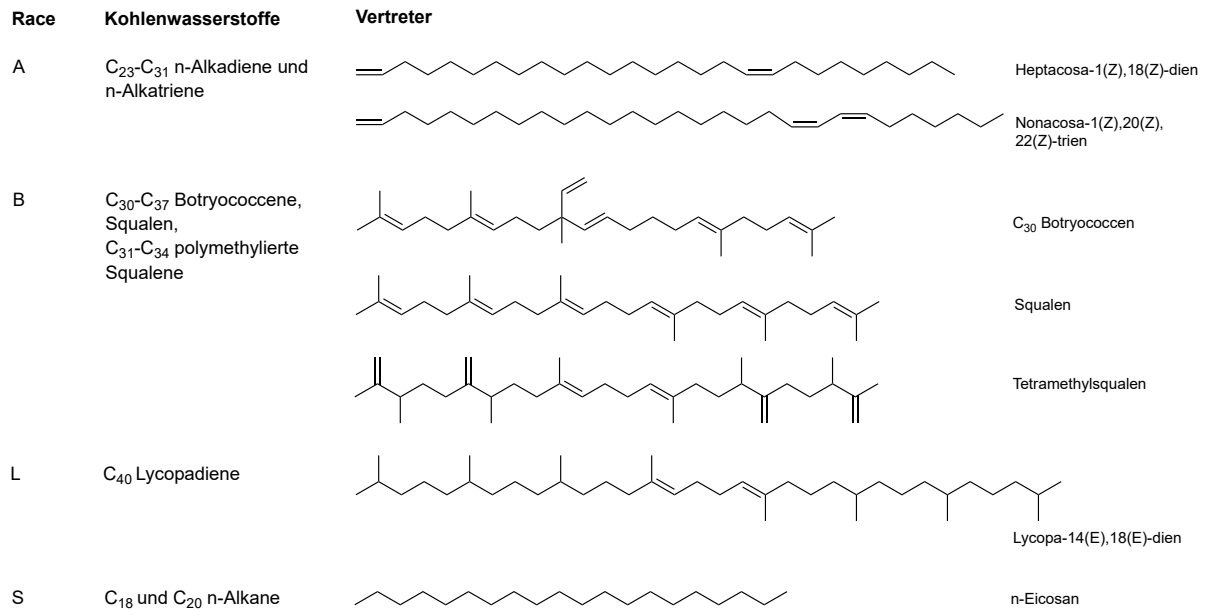


Abbildung 2-2: Kohlenwasserstoffstrukturen der unterschiedlichen Races A, B, L und S der Mikroalge *Botryococcus braunii* (Kawachi et al. 2012; Metzger and Largeau 2005; Volkman 2014). Abbildung entnommen aus Kleinert and Griehl 2021.

2.3.2 Phylogenetische Charakterisierung

Molekularphylogenetisch wurde *Botryococcus braunii* über die genetische Analyse der 18S rRNA von vier verschiedenen Stämmen durch Senousy et al. 2004 erstmals als eigenständiges Monophylum (Clade) *Botryococcus* dem Stamm (Phylum) der Chlorophyta in der Klasse der Trebouxiophyceae zugeordnet. Als nächste Verwandte von *Botryococcus braunii* in der Klasse der Trebouxiophyceae konnten dabei die Stämme des Genus *Choriocystis* identifiziert werden (Senousy et al. 2004). Bereits 2004 vermuteten Senousy et al. einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur der durch die jeweilige Race gebildeten Kohlenwasserstoffe und der Phylogenie. Dieser Zusammenhang konnte durch Kawachi et al. 2012 mittels der Sequenzanalyse der 18S rRNA von Stämmen der Races A, B, L und S bestätigt werden. Basierend auf diesen Analysen konnte eine Unterteilung der untersuchten *Botryococcus* Stämme in drei Hauptgruppen festgestellt werden, bei denen die Stämme der A-Race dem Clade I und die Stämme der B-Race dem Clade II zugeordnet wurden. Die Stämme der L- und der S-Race bilden eine gemeinsame Gruppe (Clade III) mit zwei Untergruppen für die Stämme der L- (Clade III1) und der S-Race (Clade III2). Die Ausbildung der 3 Hauptgruppen spiegelt dabei die unterschiedlichen Wege der Synthese der extrazellulären Kohlenwasserstoffe wider (Kawachi et al. 2012). Für die Stämme der B-Race konnte die höchste Divergenz festgestellt werden, was zu der Ausbildung zweier Untergruppen (Clade II1 und II2) führt und auf eine mögliche evolutionäre Diversifikation der SSL-Gene, welche für die Synthese der extrazellulären Kohlenwasserstoffe bei dieser Race verantwortlich sind, hindeutet (Niehaus et al. 2011). Anhand der phylogenetischen Analyse der 18S rRNA-Sequenzen von 70 *Botryococcus* Stämmen der Races A, B, L und S konnten Hirano et al. 2019 die Ergebnisse von Kawachi et al. 2012 bestätigen.

Neben der Analyse der 18S rRNA-Sequenzen gewinnt der Sequenzvergleich der sogenannten „Internal Transcribed Spacer“ (ITS) als ein nützlicher und auffälliger Sequenzbereich für die Identifizierung phylogenetischer Unterschiede zunehmend an Bedeutung (Hoshina 2014). Diese ITS-Regionen (ITS1 und ITS2) sind zwischen der 18S RNA und der „large subunit“-RNA der Ribosomen lokalisiert (Abbildung 2-3), wobei die Regionen der ITS1 und ITS2 durch die 5.8S RNA getrennt werden (Choudhary et al. 2015). Speziell die ITS2-Region spielt eine wichtige Rolle für die Verarbeitungsereignisse der rRNA (Musters et al. 1990) und liegt in der Sekundärstruktur für eukaryotische Organismen sehr konserviert vor (Schultz et al. 2005). Dabei ist die Primärstruktur der ITS2-Sequenz innerhalb einer Spezies sehr konserviert, aber zwischen verschiedenen Spezies extrem variabel (Chen et al. 2010b). In Kombination mit der Analyse sogenannter „Compensatory Base Changes“ (CBCs), also

Mutationen, welche in beiden Nukleotiden einer strukturellen Position unter Beibehaltung der Nukleotidbindung in der Sekundärstruktur der ITS2-Sequenzen auftreten und der Analyse von hemi-CBCs (Mutation eines einzelnen Nukleotides einer strukturellen Position), bietet die Betrachtung von ITS-Sequenzen eine optimale Ausgangsbasis für die Unterscheidung und Abgrenzung einzelner Spezies (Coleman 2000; Müller et al. 2007). Dabei kann bereits das Auftreten mindestens einer CBC in Helix III der Sekundärstruktur der ITS2-Sequenz in einer anderen Spezies resultieren (Hoshina 2014; Müller et al. 2007).

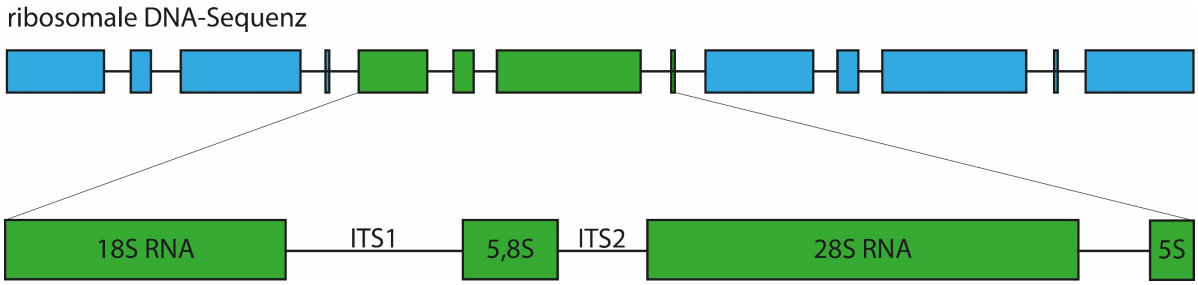


Abbildung 2-3: **Ribosomale Untereinheiten und Internal Transcribed Spacer (ITS) Regionen der ribosomalen DNA-Sequenz. Abbildung erstellt in Adobe Illustrator nach Choudhary et al. 2015**

Bezogen auf *Botryococcus braunii* konnte zum aktuellen Zeitpunkt nur eine wissenschaftliche Veröffentlichung recherchiert werden, welche sich mit der Analyse der Primär- und Sekundärstruktur der ITS2-Sequenzen auseinandersetzt. Nach Hegedűs et al. 2016 wurde über den Vergleich der ITS2-Sequenzen von 10 Eigenisolaten der A-Race mit bereits aus Datenbanken verfügbarer Sequenzen der Races A, B und L die phylogenetische Diversifizierung des Clades *Botryococcus braunii* bestätigt. Ergänzend zur den Ergebnissen von Kawachi et al. 2012 konnte innerhalb des Clades der Race A Stämme eine Aufteilung in zwei weitere Subclades (A1 und A2) detektiert werden. Aufgrund der wenigen Sequenzen, welche Hegedűs et al. 2016 zur Verfügung standen, wurden basierend auf der Analyse der CBCs der ITS2-Sekundärstruktur keine Unterschiede zwischen den Subclades A1 und A2 identifiziert. Jedoch lassen sich die Hauptgruppen der Race A (1 CBC Helix 4), B (3 CBCs Helix 2 und 3) und L (bis zu 4 CBCs Helix 2, 3 und 4) durch eine unterschiedliche Anzahl an auftretenden CBCs diversifizieren (Hegedűs et al. 2016).

Nach den Schlussfolgerungen von Hegedűs et al. 2016 bedarf es weiterer Analysen der Primär- und Sekundärstrukturen der ITS2-Sequenzen der verschiedenen Races von *Botryococcus braunii,* um Rückschlüsse bezüglich der Aufspaltung in die verschiedenen Untergruppen der einzelnen Races zu ziehen.

2.3.3 Synthese extrazellulärer Kohlenwasserstoffe

2.3.3.1 A-Race

Die *Botryococcus braunii* Stämme der A-Race produzieren langkettige Kohlenwasserstoffe mit ungeraden Kettenlängen zwischen C_{23} und C_{31} in Form von Alkadienen und Alkatrienen (Metzger et al. 1985; Metzger et al. 1988). Der Gehalt an langkettigen Kohlenwasserstoffen in der Biomasse variiert dabei zwischen 0,4 % und 61 % (Metzger et al. 1985), wobei über 30 verschiedene Strukturen der gebildeten Kohlenwasserstoffe, alle mit terminaler Doppelbindung, charakterisiert wurden (Metzger and Largeau 2005). Die gebildeten Kohlenwasserstoffe bei dieser Race werden nicht über die Isoprenoid-Biosynthese, sondern über Kettenverlängerung mit einhergehender Decarboxylierung der Fettsäure-Biosynthese erzeugt (Metzger and Largeau 2005). Ausgehend von der Ölsäure (C18:1) werden schrittweise zwei Kohlenstoffatome von Malonyl-CoA angefügt, bis die jeweilige Kettenlänge erreicht wird (Templier et al. 1987). Der finale Schritt zur Synthese der jeweiligen Kohlenwasserstoffe finden dann über Decarboxylierung der langkettigen Fettsäuren statt (Templier et al. 1984).

2.3.3.2 B-Race

Hinsichtlich der intrazellulären Verwendung des während der Photosynthese fixierten Kohlenstoffs weisen die Race B Stämme von *Botryococcus braunii* im Gegensatz zu anderen Pflanzen und Mikroalgen eine Besonderheit auf (Abbildung 2-4). Während die meisten Pflanzen und Mikroalgen mit 80 bis 85 % ein Großteil des fixierten Kohlenstoffs für den Aufbau der Biomasse verwenden, wird bei *Botryococcus braunii,* speziell bei den Stämmen der B-Race, mit ca. 45 % nur die Hälfte des assimilierten Kohlenstoffs in den Aufbau der Biomasse investiert. Die andere Hälfte, ebenfalls ca. 45 % des fixierten Kohlenstoffs, wird durch *Botryococcus braunii,* für die Synthese von Terpenoiden genutzt (Baba et al. 2012; Melis 2013). Diese Splittung des zur Verfügung stehenden Kohlenstoffs führt dazu, dass die B-Race Stämme im Vergleich zu anderen Mikroalgen ein wesentlich langsameres Wachstum, dafür aber einen deutlich höheren Lipidgehalt aufweist (Volkman 2014). Aufgrund dieser speziellen Partitionierung des aufgenommenen Kohlenstoffes konnten in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen Gesamtlipidgehalte von bis zu 86 % der Biomasse nachgewiesen werden (Borowitzka 2018b), welche in Form von langkettigen Kohlenwasserstoffen (Terpenen) einhergehend mit dem Aufbau der Biomasse (wachstumsassoziiert) gebildet werden (Kojima and Zhang 1999).

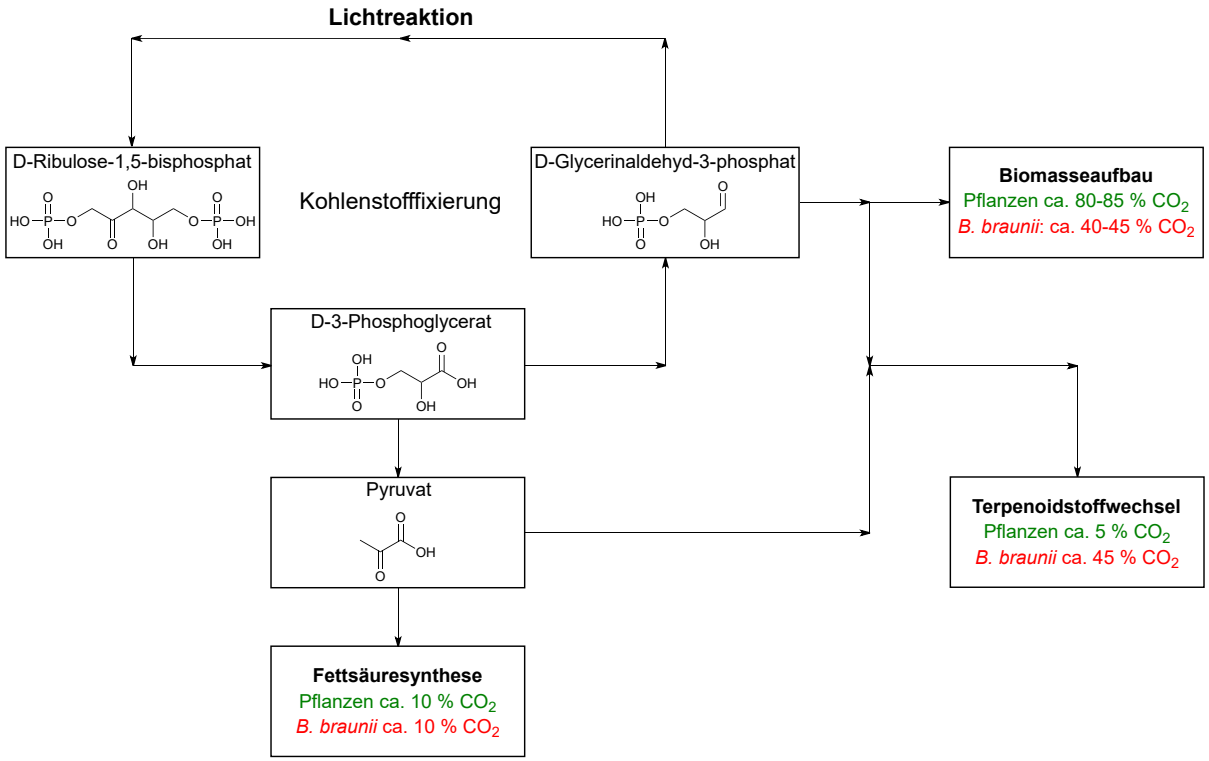


Abbildung 2-4: **Schematische Darstellung der Verwertung des über die Photosynthese fixierten Kohlenstoffs bei Pflanzen und Algen im Vergleich zu *Botryococcus braunii*. Abbildung erstellt in ChemDraw nach Melis 2013.**

Die Synthese der langkettigen Kohlenwasserstoffe bei den *Botryococcus braunii* Stämmen der B-Race erfolgt über die Terpenoid-Biosynthese (Metzger et al. 1985). Basierend auf dem hohen Anteil an synthetisierten langkettigen Kohlenwasserstoffen müssen die Grundbausteine Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) für die Isoprenoid-Biosynthese möglichst effizient bereitgestellt werden (Metzger and Largeau 2005).

Diese werden nicht wie ursprünglich angenommen, über Acetyl-CoA im Mevalonat-Zyklus, sondern aus den Intermediaten der Glykolyse Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat im Methylerythritolphosphatweg (MEP) synthetisiert (Abbildung 2-5). Über Kondensation zu 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) und weitere Schritte werden Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat letztendlich zu IPP und DMAPP synthetisiert (Metzger und Largeau 2005). Die Terpene bestehen aus linearen Polyprenyl-Pyrophosphat-Ketten, welche über schrittweise rekursive Kopf-Schwanz-(1-4)-Kondensation aus IPP und DMAPP das Monoterpen Geranylpyrophosphat (GPP) bilden. Durch anschließende Kondensationsreaktion mit einem weiteren IPP entsteht Farnesylpyrophosphat (FPP), welches das Ausgangsmolekül für die weitere Botryococcensynthese darstellt (Abbildung 2-6).

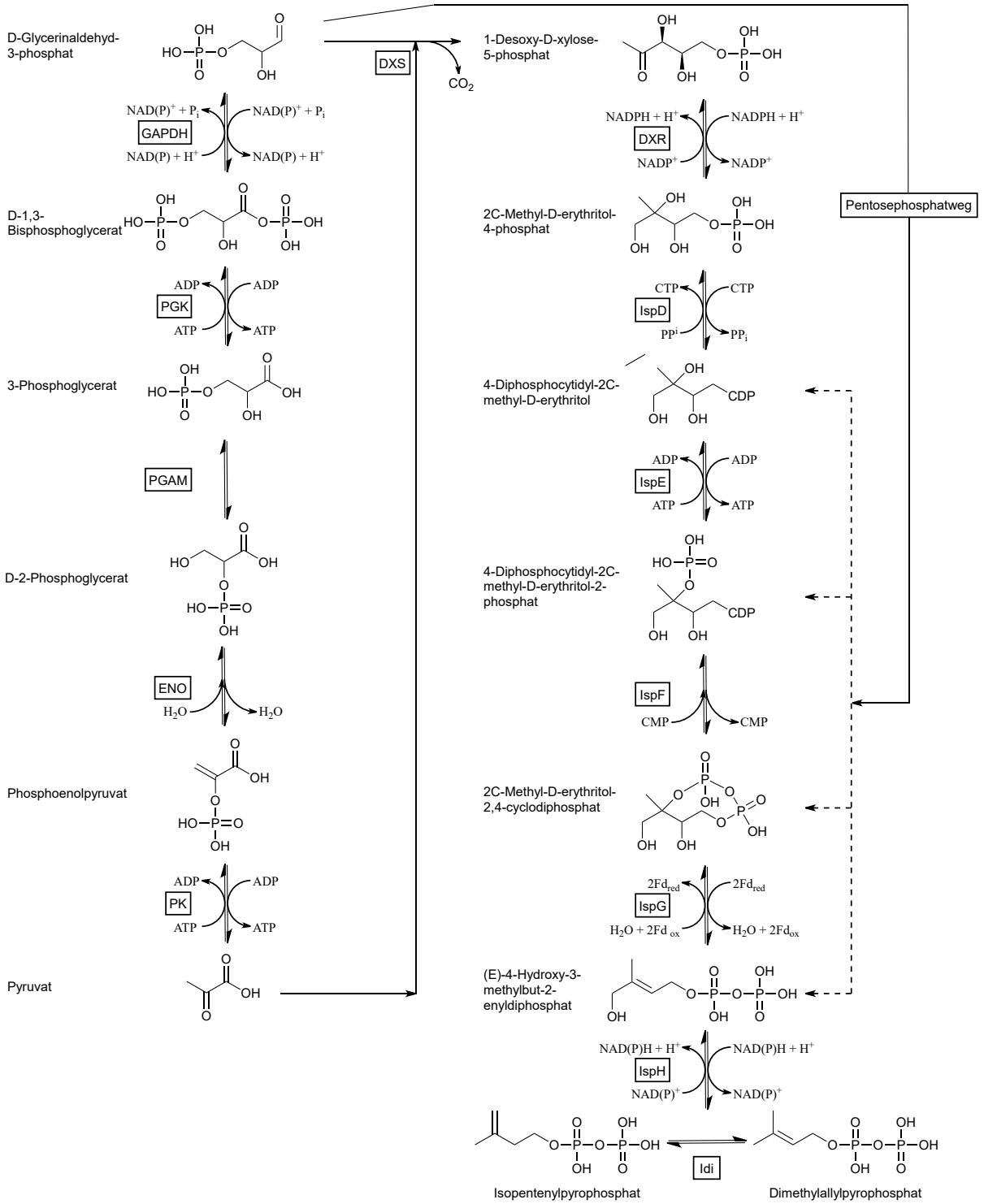


Abbildung 2-5: Biosynthese der Isoprenoid-Precursor Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat der Terpenoid-Biosynthese in den *Botryococcus braunii* Stämmen der B-Race. Abbildung erstellt in ChemDraw nach Molnár et al. 2012.

Ausgehend von FPP, welches als Grundmolekül der C_{30}-Triterpene Squalen und Botryococcen dient, werden diese dann über eine 2-stufige Reaktion gebildet (Abbildung 2-7). Erst werden zwei Moleküle FPP über Kopf-zu-Kopf-Kondensation zu Presqualendiphosphat zusammengeführt und anschließend über eine reduktive Neuanordnung mit einer C1´-1-Verknüpfung zu Squalen oder über eine C1´-3-Verbindung zu Botryococcen umgewandelt (Blagg et al. 2002).

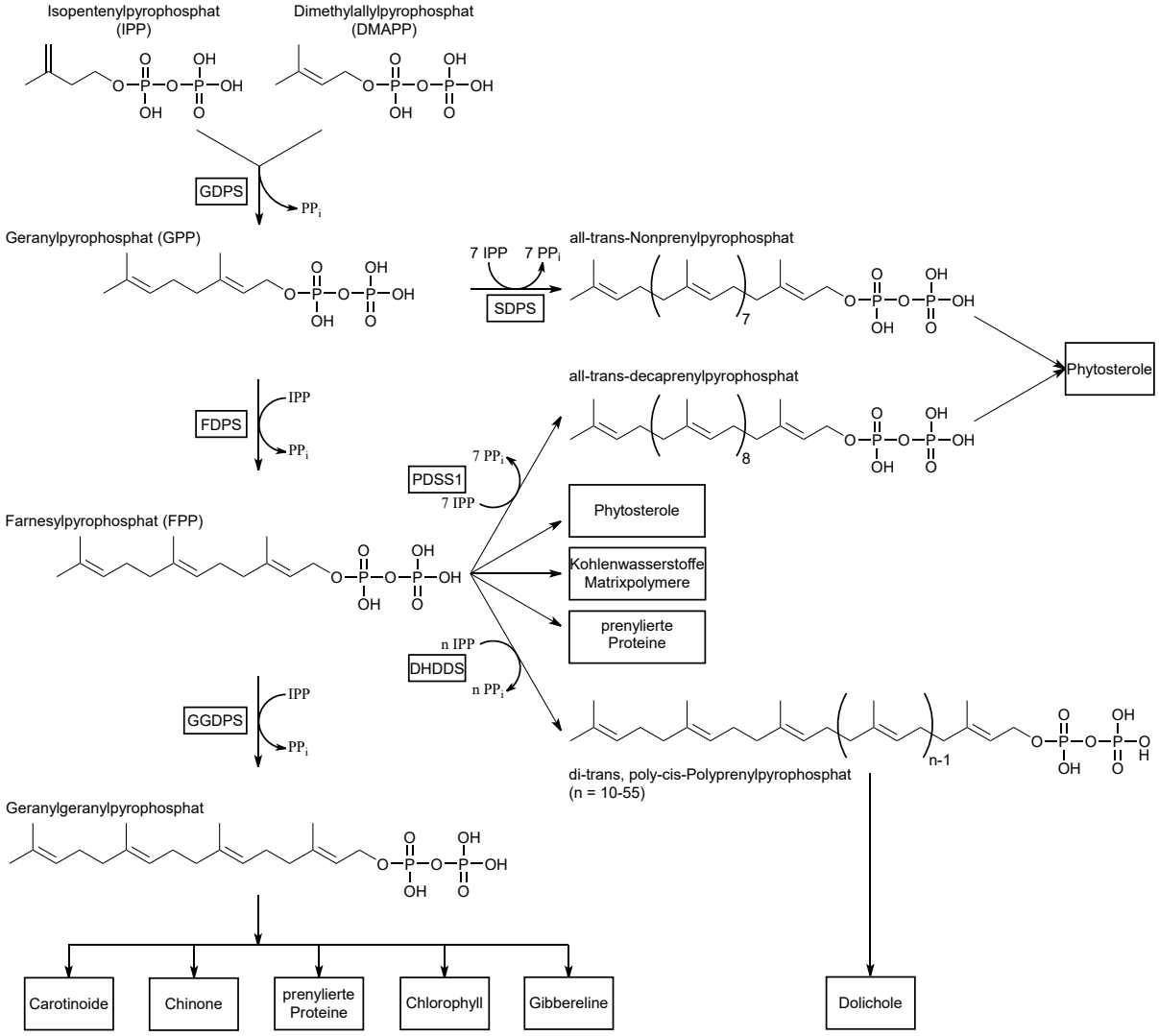


Abbildung 2-6: Biosynthese von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat als Ausgangsverbindungen für Chinone, Terpene, Chlorophylle, Speicher-Kohlenhydrate oder Matrixpolymere. Abbildung erstellt in ChemDraw nach Molnár et al. 2012.

Von Squalen ausgehend werden dann über weitere Schritte methylierte Squalene (C_{31} bis C_{34}) als Bestandteil der extrazellulären Matrix sowie Phytosterole, Cholesterole und Vitamin D3 synthetisiert (Volkman 2014). Ausgehend vom Botryococcen werden ebenfalls durch Methylierung C_{31}- und C_{37}-Verbindungen für die extrazelluläre Matrix aufgebaut (Metzger and Largeau 2005; Molnár et al. 2012).

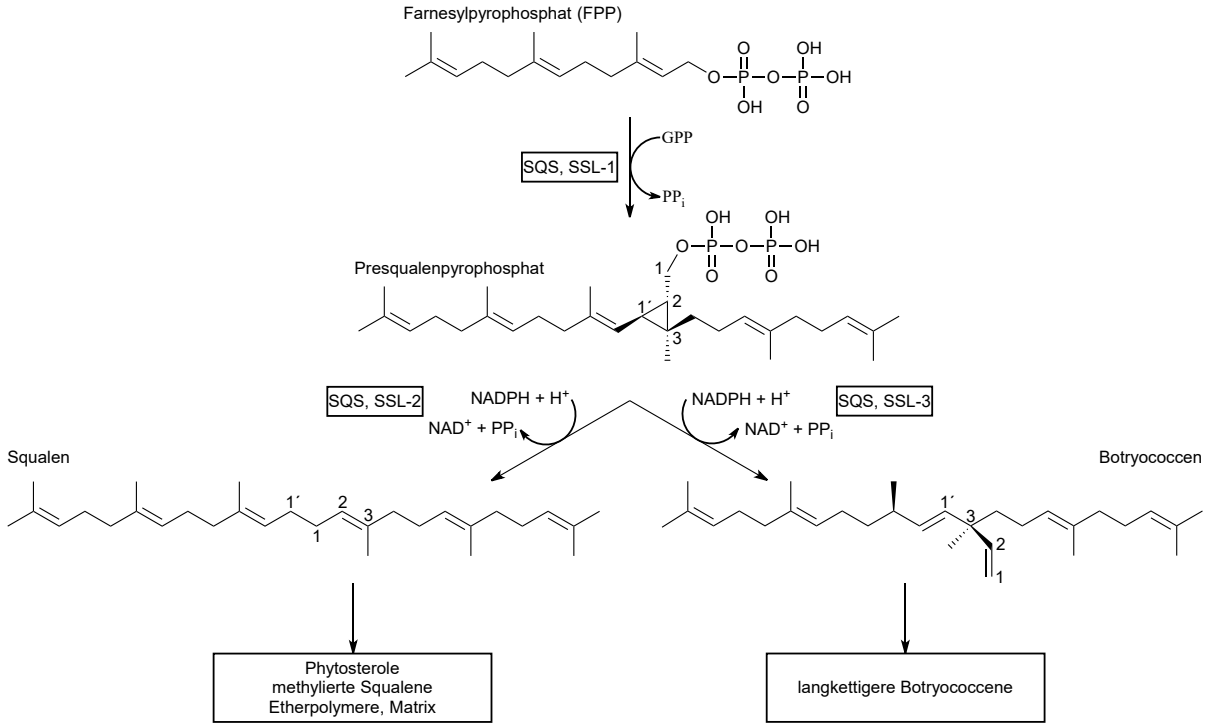


Abbildung 2-7: Biosynthese der linearen Tri- und Tetraterpene bei *Botryococcus braunii*. Abbildung erstellt in ChemDraw nach Molnár et al. 2012.

2.3.3.3 L-Race

Die *Botryococcus braunii* Stämme der L-Race produzieren hauptsächlich C_{40}-Tetraterpenoide (Metzger and Casadevall 1987). Neben Lycopatrien (1,5 %), Lycopatetraen (0,12 %) und Lycopapentaen (3 %) macht Lycopadien mit 95 % den größten Anteil der gebildeten Kohlenwasserstoffe aus (Thapa et al. 2016). Ausgehend von FPP wird wie bei den Stämmen der B-Race zunächst Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gebildet (Molnár et al. 2012). Bei den Stämmen der L-Race wird dann aus zwei Molekülen GGPP über das Enzym Lycopadiensynthase (LOS) in einer zweistufigen Reaktion zunächst Lycopahexaen gebildet und anschließend über eine noch nicht identifizierte Enzymkaskade zu Lycopadien reduziert (Thapa et al. 2016). Neben Lycopadien werden bei den Stämmen der L-Race eine Vielzahl von Etherlipiden wie Lycopanerole mit bis zu 10 % der Biomasse gebildet.

2.3.3.4 S-Race

Die durch Kawachi et al. 2012 isolierten Stämme der S-Race produzieren Epoxy-n-alkane und gesättigte n-Alkane mit respektiven Kettenlängen von C_{18} und C_{20}. Bezüglich der Biosynthese dieser Moleküle ist zum aktuellen Zeitpunkt wenig bekannt. Es wird angenommen, dass die Kohlenwasserstoffe bei dieser Race genau wie bei den Stämmen der A-Race aus der Fettsäure-Biosynthese resultieren (Kawachi et al. 2012).

2.3.4 Kohlenwasserstoffsekretion der A- und B-Race Stämme

Der Mechanismus für die Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe in die extrazelluläre Matrix bei *Botryococcus braunii* ist immer noch nicht vollkommen aufgeklärt und scheint sich Race-spezifisch zu unterscheiden (Hirose et al. 2013; Suzuki et al. 2013; Suzuki et al. 2018). Mit Hilfe von fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte bei den Stämmen der Races A und B ein direkter Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Kohlenwasserstoffsekretion ermittelt werden (Hirose et al. 2013; Suzuki et al. 2013; Suzuki et al. 2018). Für die Stämme der A-Race (Abbildung 2-8) sind in der Interphase (1) des Zellzyklus die Lipidkörper klein ausgeprägt und große Vakuolen nehmen den Raum zwischen Chloroplast und Zellkern ein. Mit einsetzendem Wachstum der Zelle (2) nehmen Größe sowie elektronenundurchlässige Inklusionen der Lipidkörper im Cytoplasma der Zelle zu und erreichen nach der Ausbildung der Trennwand (Septum) zwischen den Tochterzellen ein Maximum (3). Dieses Maximum geht mit der Bildung von runden Lipidtröpfchen auf der Zelloberfläche am apikalen Bereich der Zellen einher. Während der Ausbildung der neuen Zellwand (4) bleibt die Anzahl an Lipidkörpern konstant, jedoch werden elektronentransparente Bereiche innerhalb der Lipidkörper sichtbar. Im Zuge der vollständigen Ausbildung des Chloroplasten der Tochterzellen (5) bilden sich erneut Vakuolen im Cytoplasma der Zellen. Nach der vollständigen Ausbildung des Chloroplasten (6) treten an den basolateralen Regionen der Zelloberfläche Lipidtröpfchen auf und die Lipidkörper innerhalb des Cytoplasmas der Zellen verschwinden. Für die Stämme der A-Race steht die Zu- und Abnahme an Lipidkörpern im Cytoplasma dabei in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung von Lipidtröpfchen auf der Zelloberfläche. Die Synthese an Kohlenwasserstoffen bei den Stämmen der A-Race findet in geringem Maße über den gesamten Zellzyklus, hauptsächlich aber kurz nach der Ausbildung des Septums zwischen den Tochterzellen statt (Hirose et al. 2013).

Für die Stämme der B-Race (Abbildung 2-8) konnte prinzipiell die gleiche Zellstruktur und Ausprägung des Zellzyklus beobachtet werden wie für die Stämme der A-Race (Suzuki et al. 2013). Beide Races weisen keinen Unterschied hinsichtlich der Lokalisation der Zellorganellen, der Region der extrazellulären Lipidakkumulation am basolateralen Bereich der Tochterzellen sowie der Hauptphase der Lipidakkumulation nach der Bildung der Zellwand auf. Bezogen auf die Ausprägung der Lipidkörper hinsichtlich Zu- und Abnahme der Größe und Elektronendichte der Inklusionen kann zwischen Phase 2 und 3 ebenfalls kein Unterschied zwischen den Races festgestellt werden. Unterschiede zwischen Race A und B gibt es jedoch hinsichtlich des Zeitpunktes und der Ausprägung der Lipidkörperbildung. Während im Verlauf der Interphase (1) bei den Stämmen der A-Race keine Lipidkörper detektiert werden konnten, weisen die Zellen der B-Race Lipidkörper auf. Die Bildung neuer Lipidkörper kann bei den

Stämmen der B-Race sowohl im Verlauf der Alterung der Tochterzellen (Phase 4 und 5) als auch in Phase 2 erfolgen, wohingegen bei den Stämmen der A-Race nur im Verlauf der frühen Wachstumsphase (Phase 2) neue Lipidkörper synthetisiert werden. Verglichen mit den Stämmen der A-Race erfolgt die Akkumulation extrazellulärer Lipide am basolateralen Bereich der Tochterzellen in Form von Lipidtröpfchen bei den Stämmen der B-Race wesentlich ausgeprägter, was eine deutlich höhere Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen bezogen auf die Biomasse erklärt. Darüber hinaus erfolgt die Akkumulation extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei den B-Race Stämmen deutlich zeitiger, bevor die Ausprägung der Chloroplasten der Tochterzellen beendet ist. Eine Sekretion extrazellulärer Kohlenwasserstoffe am apikalen Bereich der Tochterzellen konnte nicht für die Stämme der B-Race festgestellt werden.

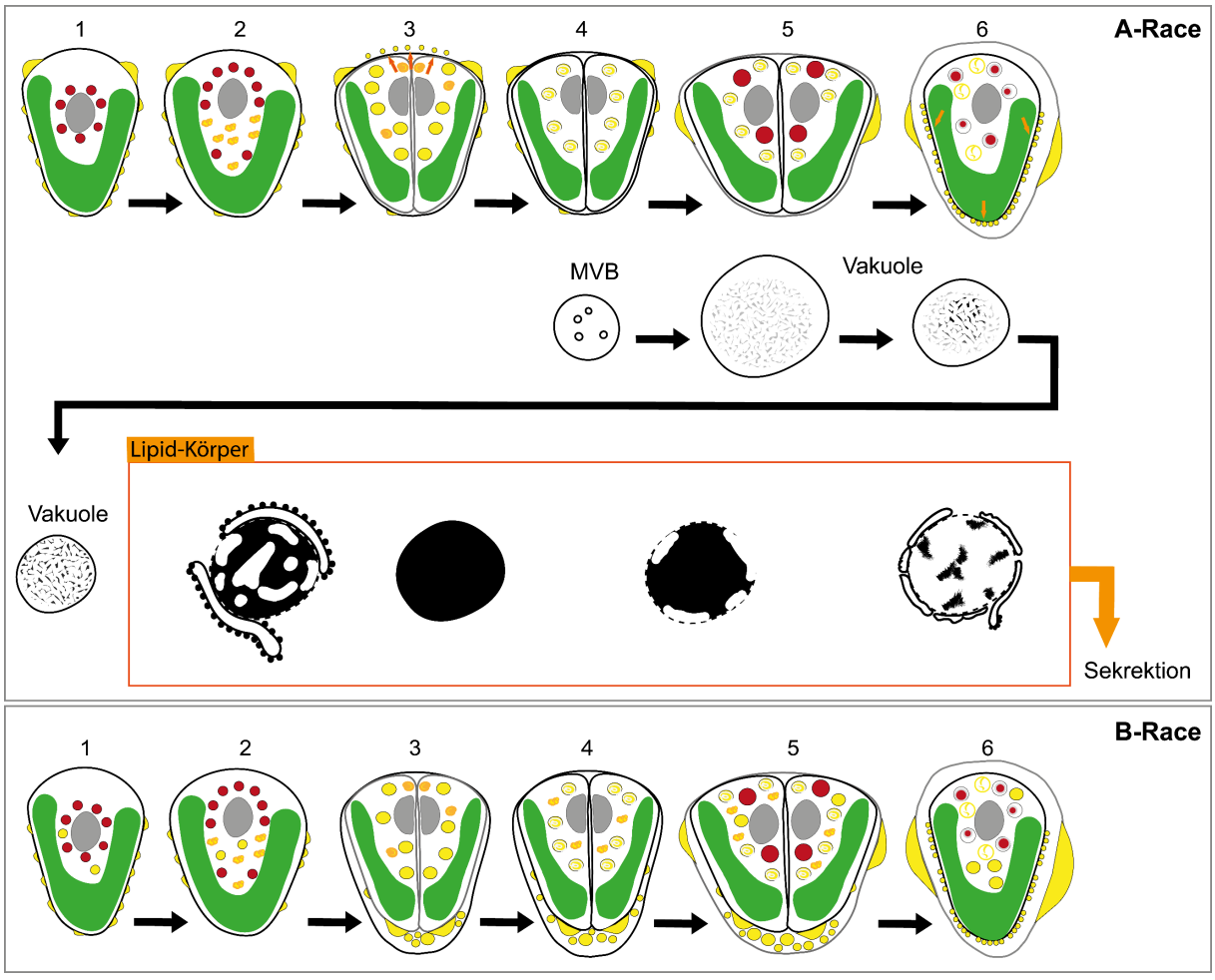


Abbildung 2-8: **Transformation der Lipidkörper und Vakuolen während des Zellzyklus des *Botryococcus braunii* A-Race Stammes UTEX 2441 (oben) und des B-Race Stammes Showa (unten). Lipidkörper im Cytoplasma und der Zelloberfläche (gelb), Vakuolen (rot), Chloroplasten (grün), Zellkern (grau), Lipidsekretion (orangener Pfeil). Abbildung erstellt in Adobe Illustrator nach Hirose et al. 2013 und Suzuki et al. 2013.**

Einen entscheidenden Einfluss auf die Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe kommt den Lipidkörpern im Cytoplasma der Zellen zu. Diese Lipidkörper sind in den meisten Lebewesen in die Regulierung der Synthese, des Verbrauchs, der Speicherung und den internen Transport intrazellulärer Lipide involviert und bestehen aus einem Kern an neutralen Lipiden, die von einer Schicht aus Phospholipiden mit assoziierten Proteinen umgeben sind (Suzuki et al. 2013). Bei Algen wie *Chlamydomonas reinhardtii* und *Dunaliella salina* setzt sich der Kern an neutralen Lipiden zu großen Teilen aus Triacylglycerolen (ca. 90 %), aber auch freien Fettsäuren und polaren Lipiden (ca. 10 %) zusammen (Davidi et al. 2012; Wang et al. 2009). Im Gegensatz dazu macht der Anteil an Triacylglycerolen bei *Botryococcus braunii* nur ca. 2 % bis 6 % der Biotrockenmasse und nur 3 % bis 9 % der Lipidkonzentration aus (Metzger and Largeau 2005). Zusammen mit der Erkenntnis, dass die langkettigen Kohlenwasserstoffe in der extrazellulären Matrix denen der Lipidkörper ähneln (Weiss et al. 2012) wird vermutet, dass die Lipidkörper bei dieser Alge nicht für die Lagerung von Speicherlipiden genutzt werden, sondern maßgeblich an der Akkumulation und Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe beteiligt sind (Suzuki et al. 2013).

Das am häufigsten verbreitete Model für die Bildung der Lipidkörper geht davon aus, dass neutrale Lipide an den Membranen der Fächer des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert, deponiert und dann als Kügelchen mit einem Monolayer aus Phospholipiden und assoziierten Proteinen ummantelt werden (Suzuki et al. 2013). Im Gegensatz dazu findet die Synthese der Lipidkörper bei *Botryococcus braunii* in becherförmigen Regionen am äußeren Rand des ER statt. Die Lipidkörper werden dabei von einer außenliegenden, sehr eng benachbarten Membran des ER umgeben, welche sich in unmittelbarer Nähe des Chloroplasten befindet (Suzuki et al. 2013).

Während in höheren Pflanzen für alle codierenden Enzyme des MEP-Stoffwechselweges Signalsequenzen des Chloroplasten nachgewiesen werden konnten, wurden diese bei *Botryococcus braunii* nur bei den Isozymen der DOXP, welche den ersten Schritt des MEP-Wegs katalysiert, nachgewiesen (Matsushima et al. 2012). Für alle anderen Enzyme des MEP-Stoffwechselweges bei *Botryococcus braunii* konnten dahingegen keine Chloroplastensignale festgestellt werden (Suzuki et al. 2013). Das Fehlen der Chloroplastensignale bei den Schlüsselenzymen SSL-1, -2 und -3, welche die finalen Schritte von Farnesylpyrophosphat zu C_{30}-Botryococcene (SSL-1 und SSL-3) bzw. Squalen (SSL-1 und SSL-2) katalysieren, legt nahe, dass diese Reaktionen außerhalb des Chloroplasten stattfinden (Niehaus et al. 2011; Suzuki et al. 2013).

Bei den *Botryococcus braunii* Zellen der B-Race steht das raue endoplasmatische Retikulum (rER) oftmals in direktem Kontakt mit den Chloroplasten und Lipidkörpern und weist an diesen

Kontaktflächen keine Ribosomen auf (Suzuki et al. 2013). Das führt zu der Annahme, dass diese Kontaktflächen womöglich als Kanal zur Weiterleitung der Precursor der Isoprenoid-Synthese aus den Chloroplasten in die Lipidkörper dient (Suzuki et al. 2013; Suzuki et al. 2018). Weiterführend konnte über die 3D-Rekonstruktion von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des ER nachgewiesen werden, dass Bereiche des ER von der Plastidenmembran der Chloroplasten über das Cytoplasma zu den Lipidkörpern reichen und damit den kürzesten Weg für die Weiterleitung der gebildeten Precursor der Isoprenoid-Synthese darstellen (Suzuki et al. 2018). Da das kortikale endoplasmatische Retikulum in *Botryococcus braunii* gehäuft auftritt und ebenfalls keine Ribosomen an der Kontaktfläche zur Zellmembran aufweist, wird für die weitere Migration der langkettigen Kohlenwasserstoffe von den Lipidkörpern an die Zelloberfläche dieser Weg als am wahrscheinlichsten erachtet (Hirose et al. 2013; Suzuki et al. 2013; Suzuki et al. 2018; Weiss et al. 2012). Diese besondere Rolle des kortikalen ER konnte durch die Untersuchungen von Suzuki et al. 2018 ebenfalls bestätigt werden. Über die 3D-Rekonstruktion der elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das ER in direktem Kontakt zur Zellmembran und den wachsenden Lipidkörpern vor der Zellteilung, als auch mit den schrumpfenden Lipidkörpern während der Lipidsekretion steht und damit direkt an der Sekretion der Lipide in die extrazelluläre Matrix beteiligt ist (Suzuki et al. 2018).

2.3.5 Koloniebildung

Basierend auf den Studien von Largeau et al. 1980, Eroglu et al. 2011, Weiss et al. 2012 und anhand eigener Beobachtungen wurde durch Suzuki et al. 2013 ein Modell der Koloniebildung und Lipidsekretion für den B-Race *Botryococcus braunii* Stamm Showa aufgestellt (Abbildung 2-9). Danach wird der basale Bereich der Zellen von äußeren Zellwänden umgeben, welche aus früheren Zellteilungen resultieren. Bei jeder Zellteilung entstehen durch die sekretierten Kohlenwasserstoffe multiple, nebeneinanderliegende Öltröpfchen an der basolateralen Region jeder Tochterzelle, welche im weiteren Verlauf durch Kollabieren der Mutterzellwand fusionieren und flache Schichten an diesem Bereich der Tochterzellen bilden. Nach erfolgreicher Zellteilung bleiben diese Kohlenwasserstoffschichten über Adhäsion an beiden Tochterzellen erhalten und führen damit zu einem Wachstum der Kolonie. Aufgrund der Flexibilität dieser dünnen Kohlenwasserstoffschichten an den basolateralen Bereichen der Zellen können diese sich in der Kolonie mit zunehmender Zellgröße unter Ausrichtung des apikalen Zellbereiches zum Kolonieäußeren neu arrangieren. Im weiteren Verlauf des Koloniewachstums ordnen sich die Zellen als sphärische Schicht an, wobei die einzelnen Zellen basolateral über die dünnen Kohlenwasserstoffschichten verbunden bleiben. Eine Kolonie kann dabei aus mehreren Subkolonien bestehen, welche im Zuge des

Koloniewachstums neu arrangiert werden können. Nach dem Erreichen einer stammspezifischen limitierenden Kolonieoberfläche findet eine Teilung der Mutterkolonie in mehrere Tochterkolonien statt. (Suzuki et al. 2013; Weiss et al. 2012)

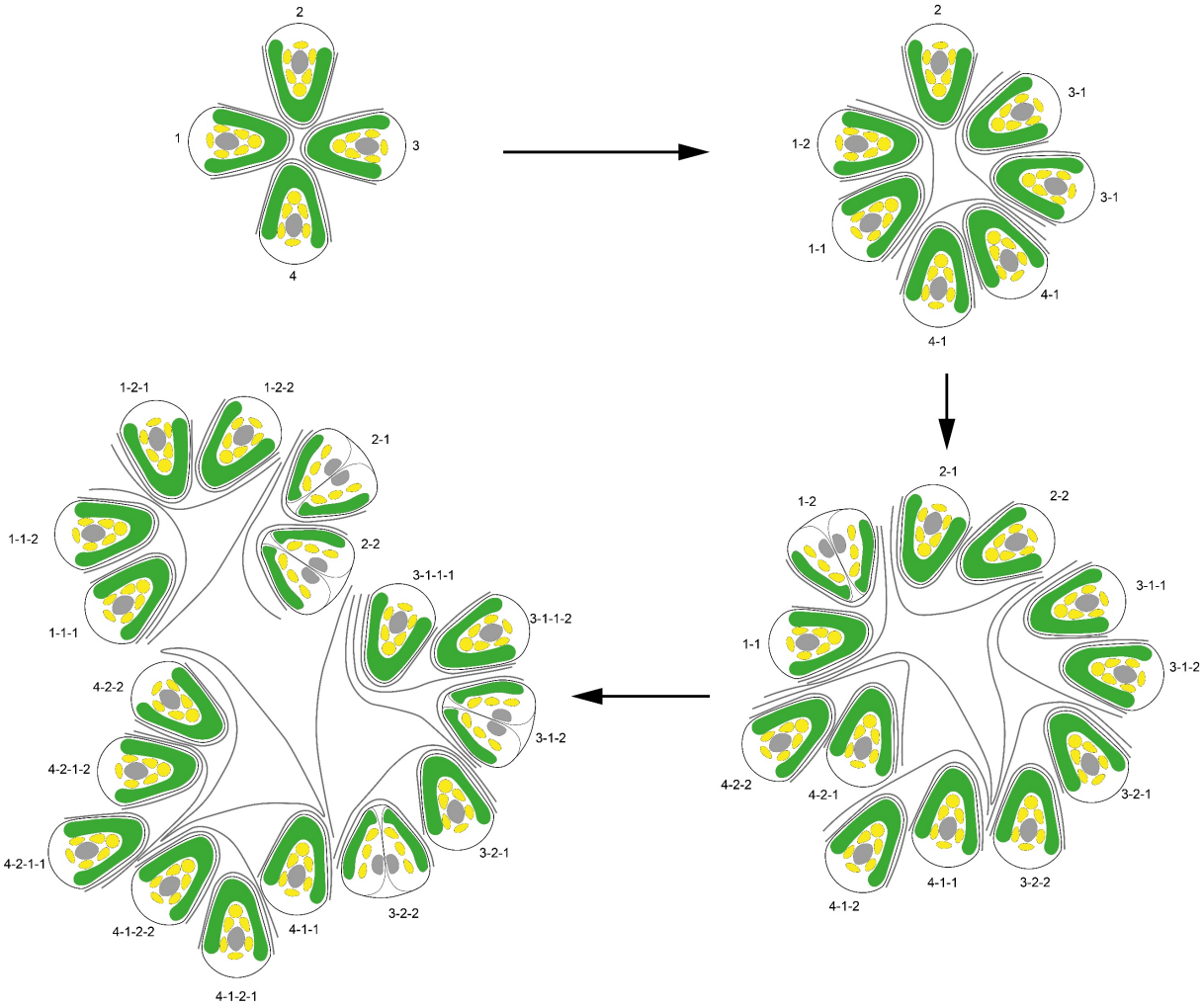


Abbildung 2-9: **Schematische Darstellung des Models der Koloniebildung bei *Botryococcus braunii* Showa. Abbildung erstellt in Adobe Illustrator nach Suzuki et al. 2013.**

2.3.6 Einflussgrößen auf das Wachstum sowie auf die Bildung und Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii*

Wie bei allen Pflanzen und Mikroalgen wird das Wachstum und die Bildung metabolischer Verbindungen bei *Botryococcus braunii* durch eine Vielzahl an Umweltfaktoren, wie Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit, Konzentration an Kohlenstoffdioxid, Intensität und Qualität des zur Verfügung stehenden Lichtes beeinflusst (Bermejo et al. 2020; Cheng et al. 2017; Gani et al. 2021; Kojima and Zhang 1999; Krzemińska et al. 2014; Ranga Rao et al. 2007).

Hinsichtlich des Wachstums übt die Temperatur bei *Botryococcus braunii* einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung der Biomasse aus. Stammübergreifend liegt das Optimum der Kultivierungstemperatur für das Wachstum zwischen 23 °C und 32 °C. Stamm- und Race-spezifisch lassen sich jedoch starke Unterschiede bezüglich des Temperaturoptimums für das Wachstum der jeweiligen *Botryococcus braunii* Stämme feststellen. Für die der A-Race zugehörigen Stämme CHN 357 (Qin and Li 2006), SAG 30.81 (Dayananda et al. 2005) und CCAP 807/2 (Kotelev et al. 2012) wurde beispielsweise ein Optimum der Wachstumstemperatur zwischen 23 °C und 25 °C ermittelt. Für den B-Race Stamm Showa lag das Optimum der Wachstumstemperatur hingegen zwischen 28 °C und 30 °C (Yoshimura et al. 2013). Neben der Beeinflussung des Wachstums übt die Temperatur auch einen großen Einfluss auf die metabolischen Prozesse innerhalb der Zellen und damit auf die Bildung der Stoffwechselprodukte aus. Beispielsweise liegt das Temperaturoptimum der Enzymaktivität des Enzyms DXS des MEP-Synthesewegs zwischen 32 °C bis 34 °C, welche sich bei weiterer Zunahme drastisch reduziert (Matsushima et al. 2012).

Neben der Temperatur werden Wachstum und Kohlenwasserstoffbildung bei *Botryococcus braunii* maßgeblich durch die zur Verfügung stehende Lichtintensität, Belichtungszeit und der spektralen Qualität des Lichtes beeinflusst. Stammspezifisch konnte für die A-Race Stämme ACOI 58, UTEX 572 und SAG 30.81 mit zunehmender Belichtungszeit eine Steigerung der Biomasse- und Kohlenwasserstoffproduktivität beobachtet werden (Krzemińska et al. 2014; Lupi et al. 1994). Hinsichtlich der Beleuchtungsintensität wirkt sich eine zu hohe Lichtintensität inhibierend und eine zu niedrige Lichtintensität limitierend auf Wachstum und Kohlenwasserstoffsynthese aus (Skjånes et al. 2013).

Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Beleuchtungsintensität für den *Botryococcus braunii* Stamm Bot22 (B-Race) ergaben, dass bei einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} ein optimales Wachstum, bei 200 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} die höchste Kohlenwasserstoffproduktivität und bei 1000 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} eine voll

ausgelastete Photosynthese vorherrscht (Sakamoto et al. 2012). Für den Stamm Showa (B-Race) wurde ein optimales Wachstum im Bereich von 240 bis 850 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} ermittelt (Yoshimura et al. 2013), wohingegen die Stämme SAG 807-1, UTEX 572, ACOI 58 und CCAP 807/2 der A-Race ein optimales Wachstum zwischen 100 und 250 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} aufweisen (Casadevall et al. 1985; Li and Qin 2005; Lupi et al. 1994; Ranga Rao et al. 2007). Neben der Beeinflussung des Wachstums hat die Lichtintensität einen großen Einfluss auf die Bildung von Chlorophyll, Carotinoiden und Kohlenwasserstoffen. Eine Erhöhung der Lichtintensität führt dabei zum Rückgang der Chlorophyll- und der primären Carotinoidkonzentrationen, sorgt jedoch auch für eine Steigerung der Kohlenwasserstoff- und sekundären Carotinoidkonzentration (Watanabe and Tanabe 2013).

Botryococcus braunii benötigt Stickstoff, Phosphor, und Kohlenstoff als primäre Nährstoffquelle zum Aufbau von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden der Biomasse. Für den Aufbau von Molekülen wie Chlorophyll, Cytochrome und spezielle Aminosäuren werden Magnesium, Eisen, Schwefel, Zink, Kupfer, Calcium, Kobalt und Molybdän als Spurenelemente benötigt (Skjånes et al. 2013). Für die Stämme UTEX 572 und SAG 30.81 konnte festgestellt werden, dass ein hohes Stickstoff-Phosphor-Verhältnis (N:P) in Kombination mit einem hohen Anteil an Stickstoff das Wachstum begünstigt (Dayananda et al. 2007). Unter den verglichenen Nährmedien stellte sich das BG11-Medium, gefolgt von CHU13-Medium, als Bestes für das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* A-Race Stämme UTEX 572 und SAG 30.81 heraus (Dayananda et al. 2007). Hinsichtlich der Stickstoffquelle können Nitrat, Ammonium, Nitrit als auch Harnstoff verwertet werden, wobei die Wachstumsraten bei Nitrat am höchsten ausfallen (Dayananda et al. 2005; Hu et al. 2009).

In Bezug auf die optimale CO_2-Konzentration lassen sich keine einheitlichen Aussagen treffen, jedoch beeinflusst diese nicht nur die Menge an gebildeten Lipiden, sondern auch deren Zusammensetzung. Für den Stamm UTEX 572 (A-Race) wurde diesbezüglich eine optimale CO_2-Konzentration zwischen 2 und 5 % ermittelt, wohingegen die optimale Konzentration für den Stamm Showa unter 1 % liegt (Ranga Rao et al. 2007; Yoshimura et al. 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die einzelnen Stämme von *Botryococcus braunii* keine einheitlichen Parametergrenzen für die Kultivierung festzustellen sind. Es ist daher erforderlich, für jeden einzelnen Stamm die optimalen Kultivierungsbedingungen zu ermitteln.

2.4 Milking (*in situ*-Extraktion) von Mikroalgen

Die Kosten für die Gewinnung von für den Menschen nutzbaren Inhaltsstoffen aus Mikroalgen stellen immer noch eine erhebliche Herausforderung im Bereich der Mikroalgenbiotechnologie dar. Basierend auf der herkömmlichen Prozessführung zur Gewinnung der Algeninhaltsstoffe (Abbildung 1-1) findet nach der Kultivierung der Algen zunächst die Ernte und Entwässerung der Kultursuspension statt. Um die präferierten Zellinhaltsstoffe zugänglich zu machen, wird anschließend die getrocknete Algenbiomasse einem Zellaufschluss unterzogen. Die Inhaltsstoffe werden dann durch Extraktion aus der Biomasse isoliert und müssen abschließend noch aufgereinigt werden, bevor das endgültige Produkt aus den Mikroalgen vorliegt. Die Schritte der Ernte, der Entwässerung und des Zellaufschlusses dieser Prozesskette sind dabei für ca. 50 % bis 80 % der kompletten Prozesskosten verantwortlich (Acién et al. 2012; Khoo et al. 2020). Schlussendlich resultieren diese Aufarbeitungskosten darin, dass die Nutzung von Mikroalgen in Form der kompletten Algenbiomasse stattfindet, da dort der Schritt des Zellaufschlusses entfällt oder Hochpreisprodukte gewonnen werden (Deviram et al. 2020).

Für die Reduzierung der Aufarbeitungskosten der Mikroalgenbiomasse werden verschiedenste Ansätze verfolgt. Unter anderem wird über das sogenannte Konzept der Bioraffinerie versucht, die Prozesskosten durch die gesamtheitliche Nutzung der Algenbiomasse unter Einbeziehung der Verwendung von Abfallströmen (nährstoffreiche Abwässer oder CO_2-haltige Abgase) für die Kultivierung, zu reduzieren (Wicker et al. 2021). Darüber hinaus wird durch Anwendung kostengünstiger Ernteverfahren wie Flokkulation oder Elektrokoagulation versucht, die Kosten der Aufarbeitung zu senken (Deviram et al. 2020; Khoo et al. 2020). Einen weiteren Ansatz stellt das Verfahren der *in situ*-Extraktion dar. Bei diesem Verfahren erfolgt die Kultivierung der Mikroalgen und die Gewinnung des Wertproduktes in einem Schritt, um die kostenintensiven Aufarbeitungsschritte der Ernte, Trocknung und Zellaufschluss einzusparen (Frenz et al. 1989; Griehl et al. 2015; Hejazi and Wijffels 2004; Jackson et al. 2020; Moheimani et al. 2014; Sim et al. 2001). Üblicherweise wird das präferierte Wertprodukt mit Hilfe eines Lösungsmittels extrahiert, welches sich mit der Kultursuspension in ein und demselben System befindet oder das Lösungsmittel durch die Kultursuspension bzw. die Kultursuspension durch das Lösungsmittel transferiert wird (Kleinegris et al. 2011a). In Abhängigkeit vom Vorkommen des Wertproduktes in der Kultursuspension kann zwischen drei Extraktionsmechanismen unterschieden werden: der Extraktion mit resultierendem Zelltod, der Extraktion durch Permeabilisierung der Zellwand oder der Extraktion durch Sekretion des Produktes (Abbildung 2-10) (Kleinegris et al. 2011b).

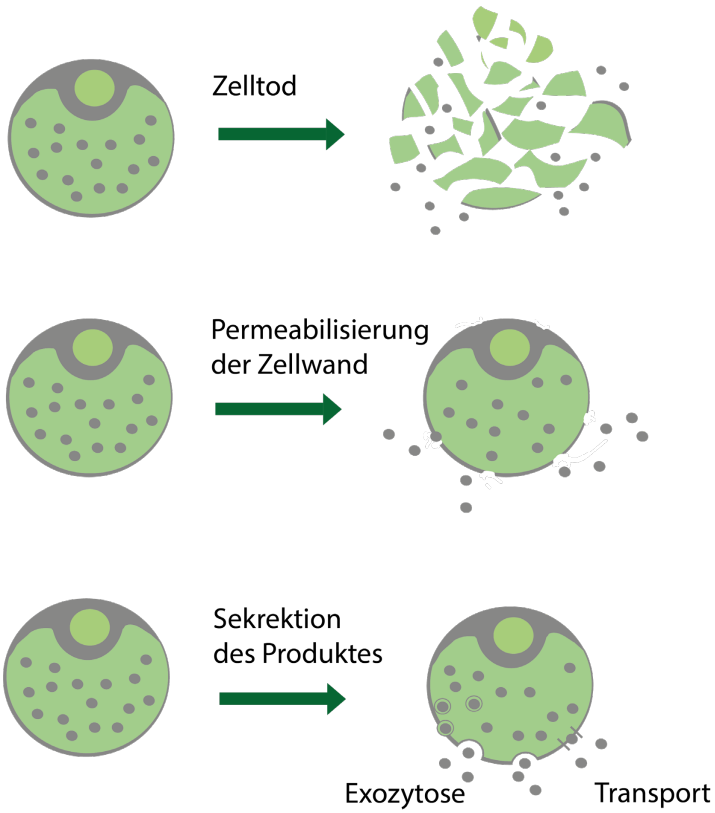


Abbildung 2-10: **Schematische Darstellung der zugrundeliegenden Extraktionsmechanismen bei der *in situ*-Extraktion von Wertstoffen aus Mikroalgen. Zelltod (oben), Permeabilisierung der Zellwand (Mitte) und Sekretion der Wertprodukte durch die Zelle (unten). Zeichnung erstellt in Adobe Illustrator nach Kleinegris et al. 2011b.**

Liegt das Wertprodukt intrazellulär vor, muss dieses durch irreversible Zerstörung der Zellwände über beispielsweise Ultraschall, Mikrowellen oder toxische Chemikalien zugänglich gemacht werden und resultiert in einem Zelltod und keiner weiteren Produktbildung durch die Zellen (Glembin 2018). Wird die Zellwand der Algen, durch Nutzung bestimmter Detergenzien, für das Lösungsmittel reversibel zugänglich gemacht oder das Lösungsmittel von der Zellwand aufgenommen, ohne die Vitalität zu beeinträchtigen, spricht man von einer Permeabilisierung. Dies kann zu einer Extraktion intrazellulärer Wertstoffe führen, ohne einen Zelltod herbeizuführen, woraufhin die Zellen neues Produkt bilden können. Schleusen die Algen das präferierte Wertprodukt eigenständig durch Exozytose oder Transport durch die Zellwand aus den Zellen in das umgebende Medium oder eine extrazelluläre Matrix aus, spricht man von einer Sekretion. Das Wertprodukt wird dann aus dem umgebenden Medium oder der extrazellulären Matrix abgetrennt und im Lösungsmittel angereichert. Zur Erhöhung der Rentabilität wird angestrebt, den Extraktionsprozess mit der gleichen Algenkultur möglichst oft zu wiederholen (Milking). Die Algenzellen sollen dabei vital bleiben, kontinuierlich neues Produkt bilden und dieses aus den Zellen ausschleusen (Bhadana and Tyagi 2019; Griehl et al. 2015; Jackson et al. 2019; Moheimani et al. 2014).

Die repetitive Durchführung der *in situ*-Extraktion mit derselben Algenkultur unter Erreichung einer möglichst hohen Ausbeute an Wertprodukt wird dabei durch verschiedene biologische und physikalische Einflussgrößen (Algenstamm, Lösungsmittel, Extraktionszeit, Phasengrenzfläche, Extraktionssystem) maßgeblich beeinflusst (Jackson et al. 2017).

2.4.1 Potenzielle Algenstämme und Stammauswahl für das Verfahren des Milkings

Wie in Abschnitt 2.2 dargestellt, gibt es eine Vielzahl von Mikroalgen, welche extrazelluläre Verbindungen produzieren (Liu et al. 2016; Xiao and Zheng 2016). Neben *Botryococcus braunii* für die Gewinnung langkettiger Kohlenwasserstoffe wurden bisher aber nur wenige Mikroalgen wie *Dunaliella* für die Gewinnung von *β*-Carotin (Hejazi et al. 2004a; Kleinegris et al. 2010), *Nannochloropsis* für die Gewinnung von Lipiden (Zhang et al. 2011), verschiedene Diatomeen für die Gewinnung von Lipiden (Vinayak et al. 2015), *Haematococcus* für die Gewinnung von Astaxanthin (Samorì et al. 2019) hinsichtlich der wiederholten Extraktion von Wertstoffen aus der Kultursuspension über das Verfahren der *in situ*-Extraktion untersucht.

Der Großteil der wissenschaftlichen Bestrebungen auf dem Gebiet findet dabei in Zusammenhang mit der Mikroalge *Botryococcus braunii* statt, welche in Abschnitt 2.3 beschrieben wurde und aufgrund des hohen Anteiles extrazellulärer Kohlenwasserstoffe und der wachstumsassoziierten Produktbildung in besonderem Maß für das Verfahren der *in situ*-Extraktion geeignet ist (Borowitzka 2018b). Aus diesem Grund wird im Nachfolgenden vorrangig auf die Mikroalge *Botryococcus* eingegangen. Wie aus Tabelle 2-4 hervorgeht, gibt es aktuell nur wenige Stämme der Mikroalge *Botryococcus braunii*, welche bereits dem Verfahren der *in situ*-Extraktion über mehrere Tage und mit mehreren Extraktionszyklen unterzogen wurden. Für die Identifizierung einer geeigneten Mikroalge und für die Rentabilität des Verfahrens der *in situ*-Extraktion spielen verschiedene stammspezifische Faktoren wie die Wachstumsrate, die Konzentration an gebildeten extrazellulären Verbindungen, die Lösungsmitteltoleranz, aber auch der Nährstoffverbrauch während der Extraktion eine entscheidende Rolle (Jackson et al. 2017).

Da die Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* vorrangig wachstumsassoziiert stattfindet (Baba et al. 2012; Kojima and Zhang 1999; Melis 2013), muss die Bildung neuer Biomasse möglichst hoch sein, um im Rahmen der *in situ*-Extraktion ein mögliches Absterben der Zellen durch die Toxizität des Lösungsmittels zu kompensieren. Die Wachstumsraten von *Botryococcus braunii* variieren in Abhängigkeit des Stammes, der Race und der Kultivierungsbedingungen sehr stark und unterscheiden sich selbst bei ein und demselben Stamm immens. Wie am Beispiel des Stammes SAG 807-1 (A-Race) wurden

Wachstumsraten zwischen 0,055 $mg_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ (Ranga Rao et al. 2007) und 0,207 $mg_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ (Jin et al. 2016) ermittelt und verdeutlicht, dass das Wachstum für jeden Stamm separat charakterisiert werden muss. Im gleichen Verhältnis muss der Anteil und die Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe möglichst hoch sein, da die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen die Effizienz der *in situ*-Extraktion maßgeblich beeinflusst (Jackson et al. 2017). Hier stehen vor allem die Stämme der B-Race im Fokus (Borowitzka 2018b), weil diese im Vergleich zu den Stämmen der A-Race eine höhere Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen akkumulieren können (Gouveia et al. 2017; Li and Qin 2005; Suzuki et al. 2013). Neben dem Biomassewachstum und der Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ist die Toleranz zum Lösungsmittel ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche *in situ*-Extraktion. Da die Kohlenwasserstoffe durch *Botryococcus braunii* nicht direkt in das umgebende Kulturmedium, sondern überwiegend in eine die Zellen umgebende Matrix sekretiert werden, muss für die Extraktion dieser Kohlenwasserstoffe ein direkter Kontakt zum Lösungsmittel bestehen (Griehl et al. 2015).

Tabelle 2-4: Auflistung von *Botryococcus braunii* Stämmen, welche bereits für das Verfahren des Milkings genutzt wurden.

Stamm (Race)	Lösungsmittel	Art der Extraktion	Dauer Zyklen	Ausbeute	Quelle
UTEX 572 (A)	n-Octan	Säulenextraktor mit zwei Blasensäulen	4 Tage 4 Zyklen	57 % der Lipide	An et al. 2004
CCAP 807/2 (A)	n-Heptan	Mischabsetzer in Erlenmeyerkolben	7 Tage 4 Zyklen	3-7 mg $g_X^{-1}\ d^{-1}$	Moheimani et al. 2013a
	n-Hexan	Säulenextraktor	5 Tage 5 Zyklen	8,7 mg $g_X^{-1}\ d^{-1}$ 5,5 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Griehl et al. 2015
SAG 807-1 (A)	n-Hexan	Säulenextraktor	5 Tage 5 Zyklen	1,2-2,7 mg $L^{-1}\ d^{-1}$ 2,5-4,4 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Griehl et al. 2015
	n-Hexan	Säulenextraktor	40 Tage 30 Zyklen	2,7 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Griehl et al. 2015
FACHB 357 (N/A)	Tetradecan	Säulenextraktor mit Membran zur Lösungsmittelverteilung	4 Tage 4 Zyklen	50 %	Zhang 2013
Bot22 (B)	n-Heptan	Mischabsetzer in Erlenmeyerkolben	70 Tage 16 Zyklen	12 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Moheimani et al. 2014
	n-Heptan	Mischabsetzer in Erlenmeyerkolben	15 Tage 3 Zyklen	7-29 mg $g_X^{-1}\ d^{-1}$ 9.5-43 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Jackson et al. 2019
	n-Dodecan	Mischabsetzer in Schüttelkolben	7 Tage 24/7	2,8 mg $g_X^{-1}\ d^{-1}$ 4,7 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Mehta et al. 2019
	n-Dodecan	Säulenextraktor	7 Tage 7 Zyklen	3,6 mg $g_X^{-1}\ d^{-1}$ 6,4 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Mehta et al. 2019
SCCAP 1761 (B)	n-Hexan	Säulenextraktor	5 Tage 5 Zyklen	26 mg $L^{-1}\ d^{-1}$	Griehl et al. 2015

Die extrazelluläre Matrix von *Botryococcus braunii* besteht dabei sowohl aus flüssigen Kohlenwasserstoffen, welche leicht durch das Lösungsmittel herausgelöst werden können, als auch aus Polysacchariden und polymerisierten Kohlenwasserstoffen, welche nicht durch das Lösungsmittel beeinflusst werden und somit den Zellen Schutz bieten können (Berkaloff et al. 1983; Metzger et al. 2008). Die Bildung der polymerisierten Kohlenwasserstoffe geht dabei mit der Bildung der flüssigen Kohlenwasserstoffe einher (Berkaloff et al. 1983; Metzger et al. 2008), was zu der Annahme führt, dass mit höherer Konzentration extrahierbarer Kohlenwasserstoffe auch einen höherer Schutz gegenüber dem Lösungsmittel einhergehen kann.

2.4.2 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels

Neben der stammspezifischen Toleranz gegenüber dem Lösungsmittel, spielen die lösungsmittelspezifischen Faktoren wie Biokompatibilität, Extraktionseffizienz, Kosten, Sicherheit und die Rückgewinnung bei der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels eine entscheidende Rolle für das Verfahren der *in situ*-Extraktion (Jackson et al. 2017).

Die Biokompatibilität eines Lösungsmittels wird prinzipiell darüber widergespiegelt, welchen Effekt das Lösungsmittel bei Kontakt mit einem Organismus auf dessen Zellvitalität ausübt (Jackson et al. 2017). Für die Ermittlung der Biokompatibilität eines Lösungsmittels auf die Zellen bei Mikroalgen gibt es verschiedene Methoden, wie die Bestimmung der Wachstumsrate (An et al. 2004) oder die Messung der Sauerstoffproduktion (Frenz et al. 1989) einer Kultur nach Kontakt mit dem Lösungsmittel. Beide Methoden spiegeln den Einfluss des Lösungsmittels auf die gesamte Kultur wider, geben aber wenig Auskunft darüber, inwieweit einzelne Zellen beeinflusst werden. Eine genauere Methode, welche den Effekt auf die einzelnen Zellen mit einbezieht, sieht Jackson et al. 2017 in der Messung der Photosyntheserate vor und nach der Lösungsmittelbehandlung über die Messung der potentiellen Quantenausbeute des Photonenflusses durch das Photosystem II mittels PAM-Fluorometrie (Beer et al. 1998). Für die Abschätzung der Biokompatibilität oder auch Toxizität eines Lösungsmittels wird in der Toxikologie oftmals der Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{Oct}$) verwendet. Dieser gibt an, wie sich eine Substanz in dem Zweiphasengemisch aus Octanol und Wasser in den jeweiligen Phasen verteilt und ist ein Maß für die Lipophilie bzw. Hydrophilie einer Substanz (Lide 2004). Frenz et al. 1989 untersuchten den Einfluss 18 verschiedener Lösungsmittel auf die Sauerstoffproduktion von *Botryococcus braunii* mit der Erkenntnis, dass der $\log P_{Oct}$-Wert sehr gut mit der Biokompatibilität korreliert. Demzufolge sind Lösungsmittel mit einem $\log P_{Oct}$-Wert kleiner 4 toxisch und Lösungsmittel mit einem $\log P_{Oct}$-Wert größer 5 biokompatibel für *Botryococcus braunii*. Lösungsmittel mit einem $\log P_{Oct}$-Wert zwischen 4 und 5 können im Fall

von Decanol oder Dipentylether toxisch oder wie bei Hexan oder Heptan nicht toxisch wirken (Frenz et al. 1989). Jackson et al. 2017 haben verschiedene Lösungsmittel, deren Biokompatibilität und Extraktionseffizienz für *Botryococcus braunii* zusammengefasst. Aus dieser Zusammenstellung lässt sich schlussfolgern, dass Lösungsmittel mit einer höheren Kettenlänge, wie Octanol oder Dodecan, eine bessere Biokompatibilität im Vergleich zu Lösungsmitteln mit einer niedrigeren Kettenlänge, wie Hexan oder Heptan, aufweisen (Jackson et al. 2017).

Neben der Biokompatibilität ist die Extraktionseffizienz des Lösungsmittels entscheidend für die *in situ*-Extraktion. Das eingesetzte Lösungsmittel muss eine hohe Affinität gegenüber dem zu extrahierenden Produkt (langkettige Kohlenwasserstoffe) aufweisen und auch an den Ort des Produktvorkommens vordringen können (Jackson et al. 2017). Im Fall von *Botryococcus braunii* liegen die langkettigen Kohlenwasserstoffe bereits extrazellulär vor, was den Zugang des Lösungsmittels deutlich erleichtert. Da die zu extrahierenden Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* hydrophober Natur sind, muss zum Erreichen einer hohen Extraktionseffizienz auch das Lösungsmittel hydrophober Natur sein. Lösungsmittel wie *n*-Octanol, Octane oder Hexan weisen alle eine hohe Extraktionseffizienz auf, wohingegen Lösungsmittel wie Dodecan oder Heptan eine geringere Extraktionseffizienz aufzeigen (Jackson et al. 2017). Unter Betrachtung der Wasserlöslichkeit, welche für Hexan oder *n*-Octanol im Vergleich zu Dodecan oder Heptan wesentlich höher ist, ist auch eine bessere Zugänglichkeit zu den einzelnen Kolonien in der wässrigen Kultursuspension während der *in situ*-Extraktion gegeben, was aber mit verringerter Biokompatibilität einhergeht (Frenz et al. 1989). Aus diesem Grund muss die Auswahl des Lösungsmittels immer einen Kompromiss zwischen Extraktionseffizienz und Biokompatibilität bilden.

Sowohl für die Rentabilität des Verfahrens der *in situ*-Extraktion, als auch aus Gründen der ressourceneffizienten Verwertung der eingesetzten Lösungsmittel, müssen diese für eine Wiederverwendung nach der Extraktion zurückgewonnen werden. Zur Abtrennung der im Lösungsmittel befindlichen langkettigen Kohlenwasserstoffe ist der Siedepunkt des eingesetzten Lösungsmittels entscheidend (Jackson et al. 2017). Aus den durch Jackson et al. 2017 zusammengefassten und für die *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* genutzten Lösungsmitteln, welche von *n*-Hexan, *n*-Heptan und *n*-Octan über *n*-Octanol, Dodecan und Dihexylether zu Tetradecan reichen, ist eine Erhöhung des Siedepunktes und damit eine signifikante Steigerung der Kosten für die Rückgewinnung ersichtlich.

Unter Einbeziehung der Parameter Biokompatibilität, Extraktionseffizienz, Siedepunkt, Kosten und Sicherheit des genutzten Lösungsmittels, ergibt sich aus dem Ranking von Jackson et al. 2017 das Lösungsmittel *n*-Hexan als am besten geeignet für die *in situ*-Extraktion von

Botryococcus braunii. Aus dem Vergleich zu den anderen evaluierten Lösungsmitteln resultiert zwar eine niedrige Biokompatibilität mit nur ca. 80 %, jedoch wirken die hohe Extraktionseffizienz mit ca. 70 %, der niedrige Siedepunkt von 69 °C, als auch die niedrigeren Kosten dem entgegen (Jackson et al. 2017).

2.4.3 Extraktionssysteme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion

Für die *in situ*-Extraktion langkettiger Kohlenwasserstoffe aus der Kultursuspension von *Botryococcus braunii* werden aktuell zwei Verfahren angewendet. Zum einen kann die Kultivierung und Extraktion in ein und demselben System stattfinden, welches nach dem Prinzip eines Mischabsetzers funktioniert (Choi et al. 2013; Mehta et al. 2019; Moheimani et al. 2013a; Moheimani et al. 2014). Zum anderen kommen Säulenextraktoren zum Einsatz, welche die Kultivierung und Extraktion räumlich voneinander trennen und damit eine bessere Steuerung der Zellvitalität erlauben (An et al. 2004; Griehl et al. 2015; Mehta et al. 2019; Zhang et al. 2013). Da bei beiden das Lösungsmittel in direktem Kontakt mit der Kultursuspension steht, unterliegen diese Verfahren den physikalischen und chemischen Prinzipien der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion nutzt man zwei flüssige Phasen, welche nur beschränkt mischbar sind. Dabei kann sich die zu extrahierende Verbindung in beiden Phasen verteilen. Der Extraktionsstoff (langkettige Kohlenwasserstoffe) ist in einem Trägerstoff, welcher auch ein Stoffgemisch sein kann (Kultursuspension mit Kolonien von *Botryococcus braunii*), gelöst. Das Lösungsmittel, welches im Optimalfall nicht mit dem Trägerstoff mischbar ist, wird in einem Mischer mit dem Trägerstoff in Kontakt gebracht und zieht den Extraktionsstoff aus der Lösung, bis sich ein Gleichgewicht zwischen beiden Phasen einstellt (Behr et al. 2010). Nach dem Stoffaustausch werden die Trägerphase und das mit dem Extraktionsstoff angereicherte Lösungsmittel in einem Abscheider aufgrund des Dichteunterschiedes beider Phasen getrennt. Das Lösungsmittel wird anschließend über beispielsweise Destillation oder Vakuumevaporation von dem Extraktionsstoff getrennt (Müller et al. 2000). Die chemischen und physikalischen Kenngrößen, wie die Berechnung des Phasenübergangs des Extraktionsstoffs zwischen Träger- und Lösungsmittelphase, die Berechnung der fluiddynamischen Kenngrößen sowie das Apparatedesign für die Auslegung von Flüssig-Flüssig-Extraktionen werden ausführlich in den Veröffentlichungen von Müller et al. 2000, Behr et al. 2010 und Schlüter 2018 dargelegt. Bei der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* wird der Phasenübergang der in der extrazellulären Matrix gebundenen Kohlenwasserstoffe aus der Kultursuspension in das Lösungsmittel durch Dispergierung der leichteren in der schweren der beiden Phasen erreicht. Das Ziel des Dispergiervorgangs durch Erzeugung von Partikel über einen Dispergierer (Rührer, Düse) ist dabei, eine möglichst große

Austauschfläche (Phasengrenzfläche zwischen Kultursuspension und Lösungsmittel) und eine möglichst lange Kontaktzeit der Kultursuspension zum Lösungsmittel (Schlüter 2018) unter Berücksichtigung der Vitalität der Kultursuspension zu gewährleisten.

Die einfachste Möglichkeit zur Realisierung der *in situ*-Extraktion ist die Nutzung des Prinzips eines Mischabsetzers. Bei diesem Verfahren wird die Kultursuspension mit einem Lösungsmittel beaufschlagt und das Lösungsmittel durch Rühren oder Schütteln in der Kultursuspension dispergiert. Nach einer definierten Extraktionszeit wird der Dispergiervorgang gestoppt und nach Phasenseparation die Lösungsmittelphase entnommen (Moheimani et al. 2013a). Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz kann bei diesem Verfahren, wie in Abbildung 2-11 ersichtlich, das Lösungsmittel unterhalb des Rührers in die Kultursuspension eingeleitet werden. Dadurch wird das Lösungsmittel in der Kultursuspension dispergiert, steigt dann an die Oberfläche und wird über eine Pumpe im Kreislauf gefördert (Choi et al. 2013). Das Prinzip des Mischabsetzers bietet dabei den Vorteil einer einfachen Handhabung, einer problemlosen Wartung und einer hohen Extraktionseffizienz (Jackson et al. 2017). Nachteil dieses Prinzips ist der stetige Kontakt des Lösungsmittels mit der Kultursuspension, was damit verbunden ist, dass sowohl die Extraktionszeit als auch die Phasengrenzfläche nicht genau ermittelt und eingestellt werden können und sich damit ein Scale-up schwierig gestaltet. Darüber hinaus kann es zu hydrodynamischem Stress der Algenzellen in der Kultursuspension aufgrund einer hohen Scherbeanspruchung durch das Dispergieren des Lösungsmittels mit Hilfe des Rührers kommen, was zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen führt (Jackson et al. 2017).

Ein Verfahren, welches eine bessere Kontrolle des Kontaktes der Kultursuspension mit dem Lösungsmittel erlaubt, stellt das Prinzip des Säulenextraktors dar (Abbildung 2-12). Bei diesem Prinzip wird die Kultursuspension über einen Bypass aus dem Kultivierungssystem in eine mit Lösungsmittel befüllte Extraktionssäule überführt. Über den Dispergierer in Form einer Düse werden Tropfen der Kultursuspension erzeugt, welche dann aufgrund der Schwerkraft das Lösungsmittel durchwandern und sich am Boden der Extraktionssäule ansammeln. Über eine Pumpe oder durch Gravitation gelangt die Kultursuspension dann zurück in das Kultivierungssystem (An et al. 2004; Griehl et al. 2015). Mit Hilfe des Durchmessers der Düse und der Einstellung des Volumenstroms kann bei diesem Prinzip die effektive Extraktionszeit, also die Zeit, in der jeder Partikel mit dem Lösungsmittel in Kontakt steht, als auch die Größe der Phasengrenzfläche zwischen Kultursuspension und Lösungsmittel exakt eingestellt werden kann. Dieses Prinzip der *in situ*-Extraktion erlaubt damit ein Scale-up des Verfahrens auf einen größeren Maßstab anhand der vorher ermittelten stammspezifischen Größen der effektiven Extraktionszeit und benötigten Phasengrenzfläche unter Berücksichtigung der

Ausbeute an Kohlenwasserstoffen und der Vitalität der Zellen in der Kultursuspension (Griehl et al. 2015).

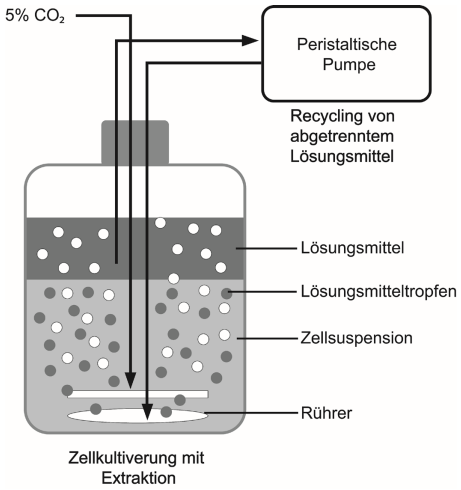


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der simultanen Kultivierung und Kohlenwasserstoffextraktion bei *Botryococcus braunii* nach dem Verfahren von Choi et al. 2013. Abbildung erstellt in Adobe Illustrator.

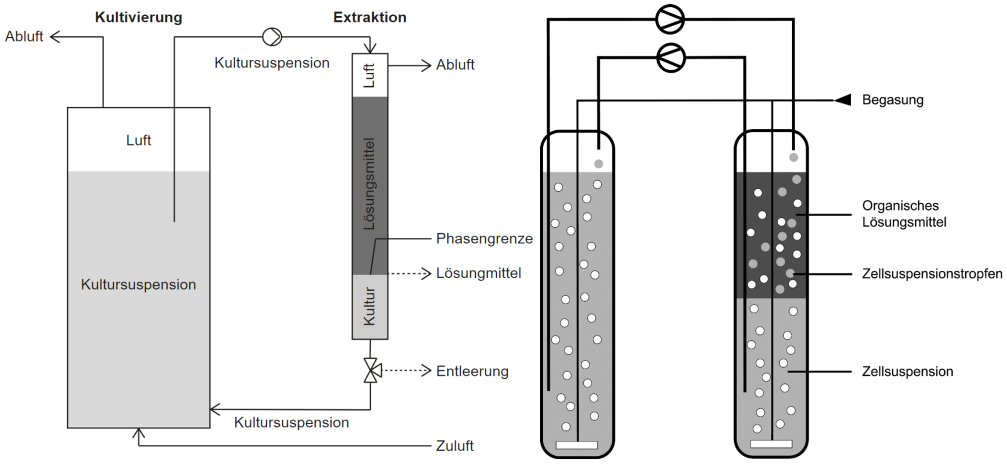


Abbildung 2-12: Schematische Darstellung der *in situ*-Extraktion nach dem Prinzip Säulenextraktor nach Griehl et al. 2015 (links) und An et al. 2004 (rechts). Abbildungen erstellt in Adobe Illustrator

3 Material und Methoden

3.1 Phylogenetische Analyse der ITS2-Regionen

3.1.1 DNA-Extraktion, PCR Amplifikation und Sequenzierung

Für die phylogenetische Analyse der primären- und sekundären Struktur der rRNA ITS2-Regionen wurde ein Vergleich der Sequenzen von 64 *Botryococcus braunii* Stämmen bzw. Isolaten durchgeführt (Anhang Tabelle 1 und Anhang Tabelle 2). Die DNA-Extraktion, PCR Amplifikation und Sequenzierung der in dieser Arbeit sequenzierten *Botryococcus braunii* Stämme erfolgte durch Frau Birgit Olberg der Abteilung Experimentelle Phykologie und Stammsammlung von Algenkulturen (EPSAG) der Georg-August-Universität Göttingen unter Verwendung der Methodik von Mikhailyuk et al. 2008. Für die Extraktion der DNA wurde Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK Molecular GmbH) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Zur Vorbereitung des Zellaufschlusses wurde für die Agarkulturen ein stecknadelgroßes Stück Algenmaterial entnommen und in 100 µL Lysispuffer überführt. Für Flüssigkulturen wurden 500 µL Algensuspension entnommen und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen, verworfen und 100 µL Lysispuffer zum Pellet gegeben. Unter Hinzugabe von Glasbeads (250 µm und 450-500 µm) in entsprechender Menge wurden die Zellen für zweimal 30 s bei 5000 rpm unter Verwendung des Power Lyzar 24 (MoBio Laboratories) aufgebrochen und anschließend sofort auf Eis gelagert.

Die Isolation der DNA erfolgte durch Zugabe von 300 µL Lysispuffer und 20 µL Proteinase S zur aufgeschlossen Algenbiomasse. Im Anschluss wurden die Proben für 40 min bei 65 °C und 450 rpm in einem Thermomixer der Firma Eppendorf inkubiert. Nach der Inkubation wurde die jeweilige Probe in ein 2 mL Receiver-Tube mit eingesetztem Pre-Filter (grün) überführt und für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Pre-Filter verworfen, 200 µL Binding-Puffer zugegeben und durch vortexen kräftig gemischt. Anschließend wurde die Probe in einen neuen Receiver-Tube mit eingesetztem Spin-Filter (gelb) überführt, für 1 min inkubiert und anschließend für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen und der Spin-Filter wieder in den Receiver-Tube eingesetzt. Nachfolgend wurden 550 µL Waschpuffer I zugegeben, für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Danach wurde die im Filter befindliche DNA für weitere zweimal mit dem Waschpuffer II, der Zentrifugation bei 11.000 rpm für 1 min und dem Verwerfen des Filtrats gewaschen und des Receiver-Tube mit Spin-Filter für 4 min bei 11.000 rpm zur Entfernung des restlichen Waschpuffers zentrifugiert. Abschließend wurde der mit DNA behaftete Filter in ein neues Receiver-Tube eingesetzt und 50 µL des vorgewärmten Elutionspuffers D zugegeben, für 3 min inkubiert und für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert.

Die PCR-Amplifikation der Proben erfolgte im Einzelansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL bestehend aus 10 µL MyTaq PCR Puffer, 1 µL Forward Primer AL1500af (GCGCGCTACACTGATGC) nach Helms et al. 2001, 1 µL Reverse Primer LR3 (CCGTGTTTCAAGACGGG) nach Friedl and Rokitta 1997, 0,5 µL MyTaq Polymerase, 36,5 µL Wasser sowie 1 µL Probe. Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers Biometra der Firma Analytik Jena durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 min gefolgt von 35 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 45 s, Annealing bei 51 °C für 45 s und Elongation bei 72 °C für 1,5 min. Die finale Elongation wurde bei 72 °C für 10 min durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse wurden im Anschluss mittels Gelelektrophorese bei 110 V und einer Laufzeit von 40 min überprüft. Vor der Sequenzierung nach Sanger wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von MSB Spin PCRapace der Firma INVITEK Molecular GmbH gefällt.

Die Sequenzierung erfolgte über einen Gesamtansatz von 10 µL mit 1 µL T-Puffer, 2 µL Big Dye Terminator Ready Reaction Mix, 2 µL Reinstwasser (HPLC-Grade), 2 µL Primer (0,8 pmol μL^{-1}) und 3 µL DNA über das Cycle-Sequencing Programm für 18 S und ITS-Standard -Primer. Die initiale Denaturierung erfolgte für 1 min bei 96 °C, die Denaturierung für 45 s bei 96 °C, das Annealing für 45 s bei 50 °C, die Elongation für 3 min bei 60 °C und das Herunterkühlen bei 10 °C. Die Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte erfolgte durch Zugabe von 30 µL 100 % Ethanol und 10 µL Reinstwasser (HPLC-Grade) zu jedem Well mit 10 µL PCR-Ansatz durch vortexen und Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben für 60 min bei 4.000 rpm und 18 °C zentrifugiert und der Überstand durch Invertieren der Microwell-Platte auf Zellstoffpapier durch Zentrifugation bei maximal 250 rpm vollständig entfernt. Die resultierenden Pellets wurden mit 100 µL 70 % Ethanol gewaschen, für 15 min bei 4.000 rpm (18 °C) zentrifugiert und der Überstand vollständig durch Invertieren der Platte auf Zellstoffpapier und kurzer Zentrifugation bei maximal 250 rpm entfernt. Die Pellets wurden anschließend für 1 min bei 95 °C getrocknet und mit 10 µL HiDi für 2 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 30 min auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe des ABI Kappillar Sequenzierers 3500 der Firma ThermoFisher.

3.1.2 Analyse der ITS2-Regionen

Die Ermittlung der ITS2-Region aus den Sequenzierungsfragmenten (18S-ITS1-5,8S-ITS2-16S RNA) der in dieser Arbeit sequenzierten und der aus der Datenbank NCBI gewonnen *Botryococcus braunii* Stämme erfolgte unter Nutzung des Programmes ITSx in der Version 1.1.3 (Bengtsson-Palme et al. 2013). Die Ermittlung der Sekundärstruktur der extrahierten ITS2-Sequenzen erfolgte über die Funktion „Model“ des Online-Tools ITS2 Database (Wolf et al. 2005b). Als Referenz für die homologe Modellierung der Sekundärstruktur wurden alle in

der ITS2 Database implementierten *Botryococcus*-Sequenzen genutzt (Hegedűs et al. 2016). Für die als Outgroup genutzten *Choriocystis*-Sequenzen wurden ebenfalls alle in der ITS2 Database verfügbaren *Choriocystis*-Sequenzen als Referenz zur Ermittlung der Sekundärstruktur verwendet. Die Modellierung der Sekundärstruktur erfolgte mit Hilfe der Matrix ITS 2 PAM 50 unter Transfer von mindestens 75 % der Helices (Koetschan et al. 2012; Merget et al. 2012; Selig et al. 2008). Für den weiteren Sequenzvergleich wurden nur die Stämme verwendet, bei denen ein Helix-Transfer von mindestens 75 % erreicht wurde. Die aus der ITS2 Database erhaltenen Sequenzen mit Sekundärstruktur wurden mit Hilfe des Programms 4SALE in der Version 1.7.1 unter Nutzung des ClustalW-Algorithmus aligned und als Sequenzalignment ohne und mit Sekundärstruktur gespeichert (Seibel et al. 2006; Seibel et al. 2008).

Für die Ermittlung eines Models zur evolutionären Betrachtung der ITS2-Regionen wurde basierend auf dem Sequenzalignment ohne Sekundärstruktur zunächst das am geeignetste Model über die Funktion „Find Best DNA/Protein Models“ des Programmes MEGA11 ermittelt (Tamura et al. 2021). Basierend auf dem Akaike Information Criterion (AIC) wurde das „General Time Reversible Model Gamma Distributed with Invariant Sites“ (GTR+G+I) als am geeignetsten für evolutionäre Betrachtung ermittelt. Mit Hilfe des Programmes MEGA11 erfolgte anschließend die Berechnung des phylogenetischen Zusammenhangs nach den statistischen Methoden Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) und Maximum Parsimony (MP) unter Verwendung der Bootstrap Methode mit 1000 Replikaten. Die Bayessche Interferenz des ITS2-Alignments ohne Sekundärstruktur wurde über das Addin „MrBayes“ (Software Geneious Prime 2021.2.2) ermittelt (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Hierfür wurden zwei unabhängige Läufe von 4 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Ketten mit 10^6 Generationen durchgeführt. Die berechneten phylogenetischen Zusammenhänge wurden alle 200 Generationen beprobt (Heat Chain Temperatur = 0,2) und die ersten 25 % Generationen als Burn-in verworfen um die Bayesian Posterior Wahrscheinlichkeiten zu berechnen.

Die evolutionäre Betrachtung der ITS2-Sequenzalignments mit Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des Programmes ProfDistS (0.9.9) durchgeführt (Friedrich et al. 2005; Müller et al. 2004; Wolf et al. 2008). Unter Anwendung der in dieser Software integrierten Q-ITS2 Matrix und GTR wurde der phylogenetische Zusammenhang mit Hilfe der statistischen Methode Neighbor Joining (NJ) berechnet. Mit Hilfe der Anwendung CBCAnalyzer (Wolf et al. 2005a) wurden die auftretenden Compensatory Base Changes (CBCs) und hemi-Compensatory Base Changes (hCBCs) der Sekundärstruktur der ITS2-Sequenzen bestimmt. Die erzeugten phylogenetischen Bäume wurden graphisch mit dem Onlinetool iTOL bearbeitet.

3.2 Kultivierung

3.2.1 Algenstämme

Die im Rahmen der Kultivierungs- und Extraktionsversuche verwendeten *Botryococcus* Stämme sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Bis zur Verwendung wurden diese in der Köthener Algae Strain Collection (KASC) gelagert. Vor der Verwendung wurden die einzelnen Stämme von Schrägagarröhrchen auf 150 mL flüssiges Nährmedium (siehe Tabelle 3-2) überführt und in 250 mL Erlenmeyerkolben auf einem Orbitalschüttler kultiviert. Nach Erreichen einer ausreichenden Biomassekonzentration wurde die Kultursuspension aus den Erlenmeyerkolben in 1,5 L BG11-Medium überführt und die jeweiligen Kulturen bis zur Verwendung in 1,5 L Blasensäulen kultiviert (1 vvm; 1 % CO_2; 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}, 6500 K Led-Beleuchtung). Zur Aufrechterhaltung der Wachstumsphase wurde in regelmäßigen Abständen ein Teil der Kultursuspension durch neues Nährmedium ersetzt.

Tabelle 3-1: Übersicht über die in den Kultivierungsversuchen verwendeten *Botryococcus* Stämme.

Stamm	Race	Nummer	Isolator	Ort	Herkunft
Botryococcus braunii	A	SAG 30.81	Hegewald, E.	Laguna Huaypo, Cuzco, Peru, 1977	SAG
Botryococcus braunii	A	SAG 807-1	Droop, M.R.	Madingley Brick Pits, Cambridge, UK, 1950	SAG
Botryococcus braunii	A	UTEX 572	Droop, M.R.	Madingley Brick Pits, Cambridge, UK, 1950	UTEX
Botryococcus braunii	A	UTEX 2441	Hegewald, E.	Laguna Huaypo, Cuzco, Peru, 1977	UTEX
Botryococcus braunii	A	CCAP 807/2	Jaworski, G.	Grasmere, Cumbria, UK, 1984	CCAP
Botryococcus braunii	A	ACOI 58	Santos, M.F.	Porto de Castanheira, Portugal, 1979	ACOI
Botryococcus braunii	A	ACOI 1257	Santos, L.	Serra da Estrela, Portugal, 2000	ACOI
Botryococcus braunii	A	SCCAP K-1489	Hansen, G.	Nieuwpoort, Belgien, 2008	SCCAP
Botryococcus braunii	B	var. Showa	Nonomura, A. M.	Berkeley, University of California, USA, 1980	University of Tokyo, S. Okada
Botryococcus braunii	B	Bot22	Kawachi, M.	Kanna, Okinawa, Japan, 2004	University of Tsukuba, M. M. Watanabe
Botryococcus sp.	B	SCCAP K-1761	Andersen, R.A.	12 Mile Lake, Michigan, USA, 2010	SCCAP
Botryococcus protuberans	N/A	CCALA 779	Santos, M.F.	Serra de Estrela, Portugal, 1987	CCALA

3.2.2 Nährmedien

Die Anfertigung der in dieser Arbeit eingesetzten Nährmedien erfolgte mit vollentsalztem Wasser. Nach dem Einwiegen und Lösen der Nährsalze wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die jeweiligen Nährmedien für 20 min bei 121 °C und 2 bar Druck autoklaviert. Vor der Nutzung wurden die jeweiligen Nährmedium an die Kultivierungstemperatur adaptiert.

3.2.2.1 Standardnährmedium

Die in dieser Arbeit verwendeten *Botryococcus* Stämme wurden standardmäßig auf dem in Tabelle 3-2 aufgeführten BG-11 Medium nach Rippka et al. 1979 kultiviert.

Tabelle 3-2: BG11-Nährmedium nach Rippka et al. 1979.

Komponente	Menge [mg L^{-1}]
$NaNO_3$	1500
K_2HPO_4 $3H_2O$	40
$MgSO_4$ $7H_2O$	75
$CaCl_2$ $2H_2O$	36
Zitronensäure	6
Ammoniumeisen-(III)-citrat	6
EDTA	1
H_3BO_3	2,86
Na_2CO_3	2
$MnCl_2$ $4H_2O$	1,81
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0,390
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,222
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,079
$Co(NO_3)_2$ $6H_2O$	0,0494

3.2.2.2 Modifizierung des Nährmediums

Für die Ermittlung der optimalen Nährstoffzusammensetzung des Nährmediums zur Kultivierung der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 wurde die Zusammensetzung des Standard BG-11 Nährmediums (Punkt 3.2.2.1) hinsichtlich der einzelnen Nährstoffkomponenten Nitrat, Phosphat, Magnesium, Calcium und Eisen variiert. Die jeweilige Variation der Standardkonzentrationen kann aus Tabelle 3-3 entnommen werden.

Tabelle 3-3: Variation der BG-11 Nährstoffkomponenten.

Komponente	K	Variation [mg L^{-1}]									
		Nitrat		Phosphat		Magnesium		Calcium		Eisen	
		0,5	0,25	0,5	2,0	0,5	2,0	0	2,0	0,5	2,0
$NaNO_3$	1500	750	375	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
K_2HPO_4 $3H_2O$	40	40	40	20	80	40	40	40	40	40	40
$MgSO_4$ $7H_2O$	75	75	75	75	75	37,5	150	75	75	75	75
$CaCl_2$ $2H_2O$	36	36	36	36	36	36	36	0	72	36	36
Ammoniumeisen-(III)-citrat	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	12

3.2.2.3 Optimiertes Nährmedium

Für die Kultivierung und Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter optimierten Nährstoffbedingungen wurde das in Tabelle 3-4 aufgeführte optimierte BG11-Medium eingesetzt.

Tabelle 3-4: Optimiertes BG11-Nährmedium für die *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22.

Komponente	Showa [mg L^{-1}]	Bot22 [mg L^{-1}]
$NaNO_3$	375	
K_2HPO_4 $3H_2O$	80	
$MgSO_4$ $7H_2O$	37,5	
$CaCl_2$ $2H_2O$	0	
Zitronensäure	6	
Ammoniumeisen-(III)-citrat	6	
EDTA	1	
H_3BO_3	2,86	
Na_2CO_3	2	
$MnCl_2$ $4H_2O$	1,81	
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0,390	
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,222	
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,079	
$Co(NO_3)_2$ $6H_2O$	0,0494	

3.2.3 Kultivierungssysteme

Für die Kultivierung wurden, wie in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt, Blasensäulen aus Glas mit einem Volumen von 1,5 und 3,0 L Kulturvolumen sowie Flat-Panel Airlift-Reaktoren mit einem Kultivierungsvolumen von 6,0 L eingesetzt. Die jeweiligen Spezifikationen der genutzen Kultivierungssysteme sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

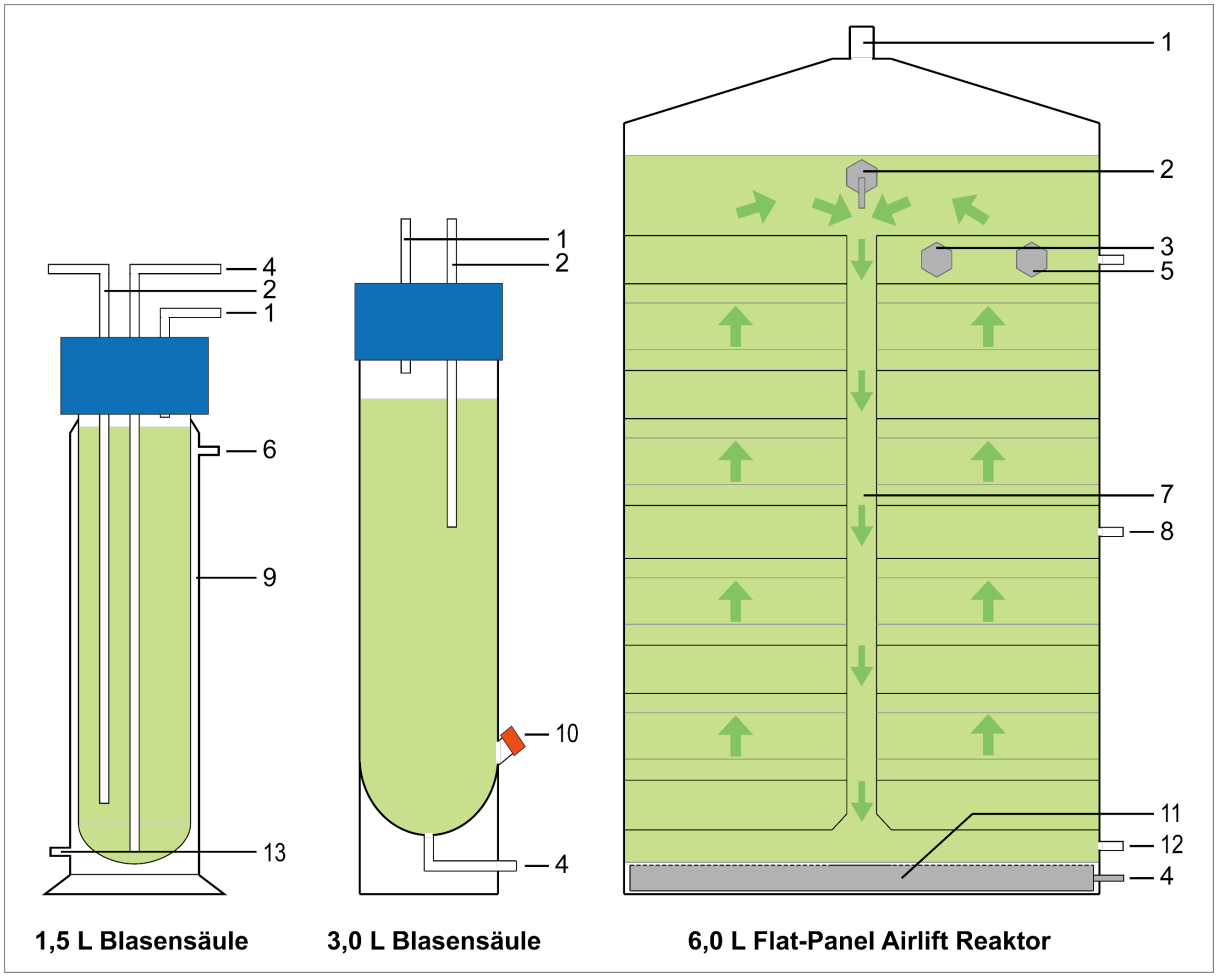


Abbildung 3-1: **Schematische Darstellung der Kultivierungssysteme. 1 Abluft, 2 Probenahme, 3 Temperatursonde, 4 Zuluft, 5 pH-Sonde, 6 Ablauf Doppelmantel, 7 Downcomer, 8 Entnahmestutzen, 9 Doppelmantel, 10 Anschluss Extraktion, 11 Begasungsmembran, 12 Zulaufstutzen, 13 Zulauf Doppelmantel. Abbildung erstellt in Adobe Illustrator 2021.**

Tabelle 3-5: **Spezifikationen der verwendeten Kultivierungssysteme.**

Parameter	1,5 L Blasensäule	3,0 L Blasensäule	6,0 L Plat-Panel Reaktor
Kultivierungsvolumen [L]	1,5	3	6
Höhe [m]	0,5	0,5	0,6
Schichtdicke [m]	0,06	0,09	0,03
Photoaktive Fläche [m^2]	0,047	0,071	0,24

3.3 *In situ*-Extraktion (Milking)

3.3.1 Verfahren der *in situ*-Extraktion

Das Milking der Algenkulturen während der Kultivierung erfolgte basierend auf dem patentierten *in situ*-Extraktionsverfahren für Algenkulturen nach Griehl and Kleinert (2014). Bei dem in Abbildung 3-2 schematisch dargestellten Verfahren wird die Kultursuspension über einen Bypass mit Hilfe einer Pumpe aus dem Kultivierungssystem in eine mit Lösungsmittel befüllte Extraktionssäule überführt. In dieser Extraktionssäule durchwandert die Kultursuspension das leichtere und mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel. Die extrazellulären Substanzen diffundieren aufgrund gleicher Polarität in das Lösungsmittel, was in einer Anreicherung der extrazellulären Substanzen im Lösungsmittel resultiert.

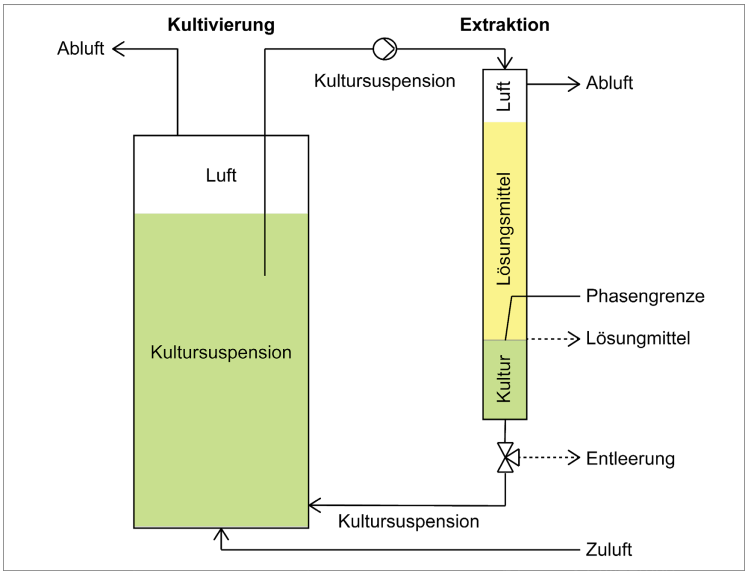


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der *in situ*-Extraktion. Zeichnung angefertigt in Adobe Illustrator 2021 nach Griehl and Kleinert 2014.

Nach dem Passieren des Lösungsmittels gelangt die extrahierte Kultursuspension über eine Verbindung zur Extraktionssäule in das Kultivierungssystem zurück, sodass Füllstand und Phasengrenze zwischen Kultursuspension und Lösungsmittel in der Extraktionssäule stetig auf gleicher Höhe bleiben. Über den Lösungsmittelablauf, welcher sich auf Höhe der Phasengrenze von Kultursuspension und Lösungsmittel befindet, kann das Lösungsmittel während der Extraktion entnommen und ausgetauscht werden. Die komplette Entleerung der Extraktionssäule erfolgt über den Ablauf am Boden der Säule. Zur Anpassung des Verfahrens auf den jeweiligen Organismus, kann die Steuerung der mittleren Verweilzeit der Kultursuspension in der Lösungsmittelphase sowohl über das Volumenverhältnis von Kultursuspension zu Lösungsmittel als auch über Drosselung des Zu- und Ablaufs der Extraktionssäule erfolgen.

3.3.2 Extraktionssysteme

Für die Realisierung der Extraktionssysteme zur Durchführung der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen *in situ*-Extraktion erfolgte eine Kombination eines 3,0 L Blasensäulen-Reaktors im Labormaßstab und eines 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktors als Scale-up im semi-technischen Maßstab mit einer Extraktionssäule nach dem gleichen Setup. Als Extraktionssäulen kamen zum einen glatte Glassäulen und zum anderen auf Basis von Vigreux-Kolonnen mit Schikanen versehene raue Säulen, welche die Turbulenz erhöhen, zum Einsatz. Der schematische Aufbau der Versuchsanlagen ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Kennzahlen zu den jeweiligen Extraktionssystemen sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Die Überführung der Kultursuspension von Kultivierungssystem zur Extraktionssäule wurde bei beiden Versuchsaufbauten mit Peristaltik-Schlauchpumpen (PD5006, Heidolph) realisiert. Für die Durchführung der Versuche zur *in situ*-Extraktion standen von beiden Versuchsaufbauten jeweils drei Stück zur Verfügung.

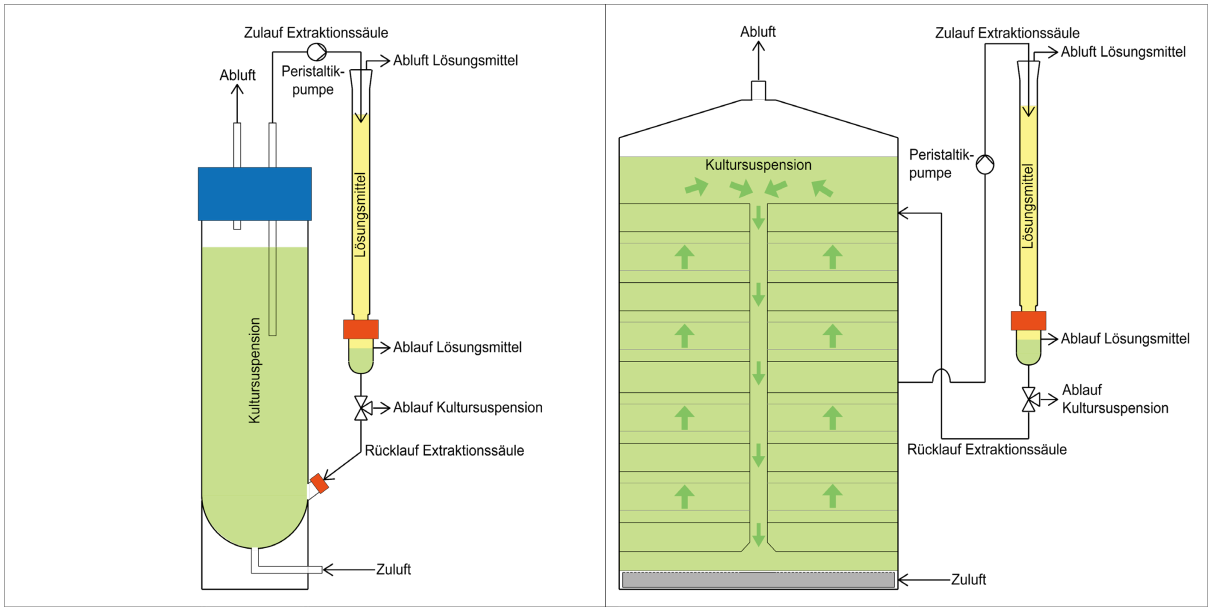


Abbildung 3-3: **Schematische Darstellung *in situ*-Extraktion mit 3,0 L Blasensäule (links) und 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktor (rechts). Abbildung erstellt in Adobe Illustrator 2021.**

Tabelle 3-6: **Spezifikation der verwendeten Extraktionssysteme.**

Parameter	3,0 L Blasensäule	6,0 L Plat-Panel Reaktor
Kulturvolumen [L]	3	6
Volumenstrom [L min^{-1}]	0,188	0,079
Lösungsmittelvolumen [L]	0,150	
Höhe Extraktionssäule [m]	0,5	
Durchmesser Extraktionssäule [m]	0,03	
Höhe Lösungsmittel [m]	0,2	

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (X) erfolgte durch Filtration der Kultursuspension durch 24 mm Glasmikrofaserfilter (VWR 696) nach einer Methode beschrieben durch Moheimani et al. 2013b. Im Vorfeld der Biomassebestimmung wurden die eigesetzten Filter mit Reinstwasser gewaschen und anschließend für 12 h bei 104°C getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator wurden die Filter auf fünf Dezimalstellen genau gewogen (Sartorius BP 210 D). Basierend auf der Zelldichte wurden 2 bis 5 mL Mikroalgensuspension mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsapparatur (Millipore 1225) und dem Anlegen von Vakuum filtriert. Die Biomasse auf dem Filter wurde zweimal mit je 5 mL Reinstwasser gewaschen, um Nährsalzrückstände zu entfernen. Nach der Filtration wurden die Filter mit Biomasse für 12 h bei 104°C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und auf fünf Dezimalstellen genau gewogen. Die resultierende Biotrockenmassekonzentration (c_X) ergibt sich mit Bezug zum eingesetzten Probelvolumen in $g_X\,L^{-1}$. Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung.

3.4.2 Ermittlung des Gehaltes extrazellulärer Kohlenwasserstoffe

Die Ermittlung des Gehaltes an extrazellulären Kohlenwasserstoffen (EKW) erfolgte mit Hilfe der getrockneten und ausgewogenen Filter nach Abschluss der Biomassebestimmung (Abschnitt 3.4.1). Die mit Biomasse versetzten Filter wurden in 40 mL Schraubdeckelgläser überführt, mit 3 mL n-Hexan versetzt und mit einem Schraubdeckel fest verschlossen. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel über Filtration durch 0,2 µm PTFE-Filter (Restek 13 mm Spritzenvorsatzfilter) in vorher auf fünf Dezimalstellen genau gewogene 20 mL Schnappdeckelgläser transferiert. Die den Biomassefilter beinhaltenden 40 mL Schraubdeckelgläser wurden zwei weitere Mal mit je 3 mL n-Hexan gespült und die Überstände in dem 20 mL Schnappdeckelglas vereinigt. Nach Evaporation des Lösungsmittels in einem Vakuumevaporator (Hettich Combi Dancer) bei 39 °C und 300 rpm wurden die Schnappdeckelgläser erneut auf fünf Dezimalstellen genau gewogen. Die resultierende Ausbeute an extrazellulären Kohlenwasserstoffen (Y_{EKW}) ergibt sich mit Bezug auf die dem Filter beaufschlagte Biomasse in $g_{EKW}\,g_X^{-1}$. Die Bestimmung des Gehaltes extrazellulärer Kohlenwasserstoffe erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung.

3.4.3 Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes

Der Gesamtlipidgehalt wurde gravimetrisch basierend auf einer modifizierten Methode von Guckert and White (1988) bestimmt. Vor der Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes wurden 2 bis 5 mL Algensuspension parallel zur Biomassebestimmung (Abschnitt 3.4.1) durch 24 mm Glasmikrofaserfilter (VWR 693) filtriert, zweimal mit je 5 mL Reinstwasser gewaschen und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Für die Gesamtlipidbestimmung wurden die gefrorenen Filter in 7 mL Schraubdeckelgläser überführt, mit 1 g Seesand (Carl Roth 8441.1) beaufschlagt und mit 5 mL des Lösungsmittelgemisches aus *n*-Hexan und Isopropanol (40 mL:26,7 mL) versetzt. Nach dem festen Verschließen der Gefäße mit einem Schraubdeckel wurden die Proben für 30 min bei 30 Hz in einer Schüttelmühle (Retsch MM200) aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Proben bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein 20 mL Glasgefäß überführt. Anschließend wurde das Pellet wieder mit 5 mL des Lösungsmittelgemisches versetzt und der gesamte Vorgang für weitere zwei Mal wiederholt. Nach Vereinigung der Überstände aus allen drei Durchgängen wurde das Lösungsmittel durch Vakuumevaporation bei 39 °C und 300 rpm abgedampft (Hettich Combi Dancer), die trockenen Proben in je 5 mL n-Hexan rückgelöst und über Filtration durch 0,45 µm PTFE-Filter (Restek 13 mm Spritzenvorsatzfilter) in ein vorher auf fünf Dezimalstellen genau gewogenes 20 mL Schnappdeckelglas überführt. Das Lösungsmittel wurde erneut über Vakuumevaporation abgedampft und die Lipid-beinhaltenden Schnappdeckelgläser auf fünf Dezimalstellen genau gewogen. Die resultierende Ausbeute an Gesamtlipiden (Y_{Lipid}) ergibt sich mit Bezug auf die dem Filter beaufschlagte Biomasse in $g_{Lipid}\ g_X^{-1}$. Die Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung.

3.4.4 Bestimmung der Nährstoffkomponenten

Der Verbrauch an Nährstoffen während der Kultivierung wurde über Ionenchromatographie ermittelt. Das für die Analyse der Komponenten verwendete Ionenchromatographiesystem (Dionex ICS 1100, Thermo Scientific) bestand aus zwei separaten Teilanalgen zur Trennung und Quantifizierung von An- und Kationen, welche zeitlich simultan injiziert und analysiert werden konnten. Die Trennung der einzelnen Ionen erfolgte über analytische Trennsäulen mit entsprechenden Vorsäulen und Suppressoren (Anionen: IonPac AS23, AG23, AERS 500 Suppressor/Kationen: IonPac CS12A, CG12A, CERS 500 Suppressor) der Firma Thermo Fisher. Als Eluent wurde für Anionen wässriger Carbonatpuffer (4,5 mM Na_2CO_3/0,8 mM $NaHCO_3$) und für Kationen 20 mM Methansulfonsäure verwendet. Beide Systeme wurden im Bereich 1 bis 100 mg L^{-1} des jeweiligen Ions kalibriert und die zu analysierenden Nährmedien im Vorfeld filtriert und bezogen auf die Bestimmungsgrenze der Systeme verdünnt.

3.4.5 Bestimmung der Lösungsmittelkompatibilität

Die Ermittlung der Lösungsmittelkompatibilität der eigesetzten Lösungsmittel zu den untersuchten *Botryococcus*-Stämmen erfolgte anhand einer modifizierten Methode von Frenz et al. (1989). Hierfür wurden 20 mL Kultursuspension in ein 30 mL Schnappdeckelglas überführt und mit 10 mL des entsprechenden Lösungsmittels (*n*-Hexan, *n*-Heptan oder *n*-Octan) überschichtet. Nach dem Verschließen der Schnappdeckelgläser wurden diese für 5 bzw. 10 min bei 60 rpm mit Hilfe einer elektrisch angetriebenen Drehscheibe invertiert. Von der mit Lösungsmittel behandelten Kultursuspension wurden 15 mL in ein 25 mL Schnappdeckelglas überführt und die Sauerstoffproduktivität bestimmt (Abschnitt 3.4.6). Das Lösungsmittel wurde in vorher auf fünf Dezimalstellen genau gewogene 20 mL Glasgefäße überführt, durch Vakuumevaporation bei 39 °C und 300 rpm abgedampft (Hettich Combi Dancer) und die Glasgefäße erneut auf fünf Dezimalstellen genau gewogen. Die resultierende Ausbeute an extrahierbaren Kohlenwasserstoffen (Y_{EKW}) ergibt sich mit Bezug auf die eingesetzte Biotrockenmasse in $g_{EKW}\ g_X^{-1}$. Die Bestimmung der Lösungsmittelkompatibilität erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung.

3.4.6 Ermittlung der Sauerstoffproduktivität

Die Vitalität der untersuchten *Botryococcus*-Stämme nach Behandlung mit dem jeweiligen Lösungsmittel (siehe Abschnitt 3.4.5) wurde anhand der Sauerstoffbildung ermittelt (Frenz et al. 1989). Hierfür wurden 15 mL Algensuspension in ein 25 mL Schnappdeckelglas überführt und für 12 h unter kompletter Abschottung vor Licht dunkeladaptiert. Nach der Dunkeladaption wurden die Kultursuspension-beinhaltenden Glasgefäße auf einer Lichtbank platziert und eine optische Sauerstoffelektrode (InLab Optiox, Mettler Toledo) eingetaucht. Die Sauerstoffelektrode wurde bis zur kompletten Luftverdrängung eingetaucht und das Glasgefäß luftdicht verschlossen. Danach wurde der 25 mm Bodendurchmesser des Gefäßes mit einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen $m^{-2}\ s^{-1}$ beleuchtet und die Sauerstoffproduktion über einen Zeitraum von 15 min alle 30 s aufgezeichnet. Über den Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration in der Kultursuspension und der eingesetzten Biotrockenmassekonzentration wurde die Sauerstoffproduktionsrate in $mg_{dO2}\ g_X^{-1}\ h^{-1}$ ermittelt.

3.4.7 Mikroskopie und Ermittlung der Koloniegröße

Die mikroskopische Begutachtung der Algenkulturen erfolgte mit Hilfe eines Olympus BX41 Mikroskops. Für photographische Aufnahmen wurde eine Olympus XC50 Digitalkamera genutzt. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder wurde über die Olympus cellSens Software realisiert. Die Nachbearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop 2021 durchgeführt.

Die Ermittlung der Koloniegröße erfolgte mit Hilfe einer FlowCam (Fluid Imaging Technologies). Unter Nutzung der Durchflusszelle FC300 (Tiefe: 300 µm; Länge 3000 µm) wurden 100000 Partikel (Kolonien) bei einem Volumenstrom von 0,8 mL min^{-1} und einer Auto-Image Rate von 3 Aufnahmen pro Sekunde vermessen. Die Vermessung der Partikel erfolgte mit einem Dark Pixel Threshold von 50 und einer Entfernung zum nächsten Partikel von 5 µm.

3.5 Berechnungen

3.5.1 Berechnung der Biomasseproduktivität und des Nährstoffverbrauchs

Die mittlere volumetrische Biomasseproduktivität ($\bar{P}_X$) sowie der mittlere Nährstoffverbrauch für Nitrat und Phosphat ($\overline{U}_{N,P}$) wurde mit Hilfe der Gleichung (3-1) ermittelt. Diese ergibt sich aus der Division der Subtraktion von Initialbiomassekonzentration ($c_{X_{Start}}$) bzw. dem Ausgangsgehalt an Nährstoff ($c_{N,P_{Start}}$) zum Startzeitpunkt der Kultivierung mit der Biomassekonzentration bzw. dem Gehalt an Nährstoffen zum Ende der Kultivierung (c_X bzw. $c_{N,P}$) durch die Kultivierungszeit (t_C) in g_X L^{-1} d^{-1}.

$$\bar{P}_X, \overline{U}_{N,P} = \frac{c_{X,N,P} - c_{X,N,P_{Start}}}{t_c} \quad (3\text{-}1)$$

Für die Ermittlung der maximalen volumetrischen Biomasseproduktivität ($P_{X,max}$) und des maximalen volumetrischen Nährstoffverbrauchs ($U_{N,P,max}$) wurde die Gleichung (3-2) nach Tjørve and Tjørve (2017) angewandt.

$$P_{X,max}, U_{N,P,max} = \frac{a\,k}{e} \quad (3\text{-}2)$$

Hierfür wurden die experimentell ermittelten Daten der Biotrockenmasse bzw. des Nährstoffverbrauchs über die Kultivierungszeit in das sigmoidale Wachstumsmodell nach Gompertz (3-3), welches Anwendung für das Wachstum von Bakterien und Mikroalgen findet (Gonçalves et al. 2016), integriert. Die zeitliche Veränderung der Biotrockenmasse bzw. des Nährstoffverbrauchs wird durch y repräsentiert. Die Amplitude der Gleichung wird durch a dargestellt und k ist ein Faktor für die Biomasseakkumulation bzw. die Nährstoffabnahme. Das Zentrum oder der Wendepunkt der Gleichung wird durch x_c wiedergegeben.

$$y = ae^{-e^{(-k(x-x_c))}} \quad (3\text{-}3)$$

3.5.2 Berechnung der effektiven Extraktionszeit und -oberfläche

Die Berechnung der effektiven Extraktionszeit, der Kontaktzeit der Kultursuspension zum Lösungsmittel ($t_{EXT,eff}$) und der effektiven Extraktionsfläche, der entstehenden Grenzfläche zwischen Kultursuspension und Extraktionsmittel ($A_{EXT,eff}$) während der Extraktion erfolgte aus den Gleichungen (3-4) und (3-5). Die effektive Extraktionszeit ($t_{EXT,eff}$) ergibt sich aus dem extrahierten Kulturvolumen (V_{EXT}), der Höhe des Lösungsmittels in der Extraktionssäule (h_S), dem Reaktorvolumen (V_R) und der relativen Sinkgeschwindigkeit der Kultursuspension durch das Lösungsmittel (w_e). Die effektive Extraktionsfläche wurde auf Grundlage des extrahierten Kulturvolumens (V_{EXT}) sowie des Partikelvolumens (V_P) und der Partikeloberfläche (O_P) der durch das Lösungsmittel gewanderten Kultursuspensionstropfen ermittelt.

$$t_{EXT,eff} = \frac{V_{EXT}\, h_S}{V_R\, w_r} \tag{3-4}$$

$$A_{EXT,eff} = \frac{V_{EXT}\, O_P}{V_P} \tag{3-5}$$

Für die das Lösungsmittel durchwandernden Partikel und deren Kennzahlen (Sinkgeschwindigkeit, Partikelvolumen und Partikeloberfläche) spielt der mittlere Partikeldurchmesser (d_P) oder auch Sauterdurchmesser (d_{S32}) eine entscheidende Rolle. Für die Ermittlung dieses Partikeldurchmessers wurde zunächst berechnet, in welchem Maß die Tropfenbildung beim Eintritt der Kultussuspension in die Lösungsmittelphase stattfindet. Die zur Charakterisierung der Partikelbildung benötigte Weber-Zahl (We_N) ergibt sich aus der Geschwindigkeit der Kultursuspension in der Öffnung der Düse (w_N^2), dem Düsendurchmesser (d_N), der Dichte der dispersen Phase (ρ_D) und der Oberflächenspannung der Kultursuspension im Lösungsmittel (σ) mit der Gleichung (3-6). Für $We < 2$ wurde von der Entstehung von Einzelpartikeln, der sogenannten periodischen Tropfenbildung und bei $We \geq 2$ von der Entstehung von Partikelschwärmen, dem sogenannten Strahlzerfall ausgegangen (Schlüter 2018).

$$We_N = \frac{w_N^2\, d_N\, \rho_D}{\sigma} \tag{3-6}$$

3.5.2.1 Berechnung der Tropfengröße bei periodischer Tropfenbildung

Für die Berechnung des entstehenden Tropfendurchmessers im Bereich der periodischen Tropfenbildung ($We < 2$) wurde ein einstufiges Model nach Voit et al. (1987) verwendet. Hierbei wurde vereinfachend von einem quasistationären Kräftegleichgewicht zwischen

Auftriebskraft (3-7), Zähigkeitskraft (3-8), Trägheitskraft (3-9) und Oberflächenspannungskraft (3-10) ausgegangen (Schlüter 2018). Der Tropfendurchmesser (d_P) welcher das Lösungsmittel durchwandernden Kultursuspension bei periodischer Tropfenbildung wurde aus der iterativen Lösung der Gleichung (3-11) berechnet.

$$F_A = \frac{\pi}{6}\,\Delta\rho\; g\; d_P^3 \tag{3-7}$$

$$F_\eta = 15\,\eta_K\;\frac{\dot{V}_D}{d_P} \tag{3-8}$$

$$F_T = 1{,}3\;\rho_K\left(\frac{\dot{V}_D}{d_P}\right)^2 \tag{3-9}$$

$$F_\sigma = \pi\; d_N\;\sigma \tag{3-10}$$

$$d_P = \left[\left(\frac{F_\eta + F_T + F_\sigma}{\Delta\rho * g}\right)\frac{6}{\pi}\right]^{\frac{1}{3}} \tag{3-11}$$

3.5.2.2 Berechnung der Tropfengröße bei Strahlzerfall

Die Berechnung des entstehenden Tropfendurchmessers (d_{S32}) im Bereich des Strahlenzerfalls ($We \geq 2$) erfolgte mit Hilfe der empirischen Gleichung (3-12) nach Ruff et al. (1976). Die für diese Gleichung benötigte kritische Durchströmungsgeschwindigkeit des Dispergierers (w_{krit}) bei maximaler Strahlenlänge wurde anhand der Gleichung (3-13) ermittelt (Schlüter 2018). Für die Berechnung des sich bei der kritischen Durchströmungsgeschwindigkeit einstellenden minimalen Partikeldurchmessers ($d_{P_{min}}$) wurden die Gleichungen (3-14) bzw. (3-15) nach Ruff et al. (1976) herangezogen.

$$d_{S32} = d_{P_{min}}\left(2{,}319 - 1{,}669\;\frac{w_N}{w_{krit}} + 0{,}709\left(\frac{w_N}{w_{krit}}\right)^2 - 0{,}114\left(\frac{w_N}{w_{krit}}\right)^3 + 0{,}00629\left(\frac{w_N}{w_{krit}}\right)^4\right) \tag{3-12}$$

$$w_{krit} = \sqrt{\frac{2\;\sigma}{\rho_D\; d_N}} \tag{3-13}$$

$$d_{P_{min}} = d_N\left(2{,}3 - 0{,}73\sqrt{\frac{\Delta\rho\; g\; d_N^2}{\sigma}}\right) \quad \text{für} \quad \sqrt{\frac{\Delta\rho\; g\; d_N^2}{\sigma}} < 2{,}2 \tag{3-14}$$

$$d_{P_{min}} = d_N\left(\frac{2{,}3}{1+\sqrt{\frac{\Delta\rho\; g\; d_N^2}{\sigma}}}\right) \quad \text{für} \quad \sqrt{\frac{\Delta\rho\; g\; d_N^2}{\sigma}} \geq 2{,}2 \tag{3-15}$$

3.5.2.3 Berechnung der relativen Tropfensinkgeschwindigkeit

Die relative Sinkgeschwindigkeit (w_r) der durch den Dispergierer entstehenden Tropfen ergibt sich aus der Reynolds-Zahl des Partikels (Re_P), dem Tropfendurchmesser (d_P bzw. d_{S32}) sowie aus der dynamischen Viskosität (η_K) und der Dichte (ρ_K) der kontinuierlichen (Lösungsmittel) Phase und wurde mit Hilfe der Gleichung (3-16) ermittelt.

$$w_r = \frac{Re_P\,\eta_K}{d_P\,\rho_K} \tag{3-16}$$

Die Berechnung der Reynolds-Zahl des entstehenden Partikels erfolgte auf Grundlage der Archimedes-Zahl (Ar) mit Gleichung (3-17) und der modifizierten Flüssigkeitskennzahl ($K_{F,\Delta\rho}$) mit Gleichung (3-18) (Schlüter 2018). Darauf basierend wurde auf das sich einstellende Verhalten der entstehenden Tropfen in Form einer starren Phasengrenze (Bereich A), einer inneren Zirkulation (Bereich B) bzw. einer Oszillation (Bereich C) geschlossen und die dem jeweiligen Bereich entsprechende Reynolds-Zahl mit den Gleichungen (3-19), (3-20) und (3-21) berechnet.

$$Ar = \frac{d_P^3\,g\,\rho_K\,\Delta\rho}{\eta_K^2} \tag{3-17}$$

$$K_{F,\Delta\rho} = \frac{\rho_K\,\sigma^3}{g\,\eta_K^4}\frac{\rho_K}{\Delta\rho} \tag{3-18}$$

Bereich A

$$Ar \leq 1{,}83\,K_{F,\Delta\rho}^{0,275} \quad \text{mit} \quad Re_P = \frac{1}{18}\,Ar \tag{3-19}$$

Bereich B

$$1{,}83\,K_{F,\Delta\rho}^{0,275} \leq Ar \leq 372{,}9\,K_{F,\Delta\rho}^{0,275} \quad \text{mit} \quad Re_P = K_{F,\Delta\rho}^{0,15}\left(Ar^{0,523}\,K_{F,\Delta\rho}^{-0,1435} - 0{,}75\right) \tag{3-20}$$

Bereich C

$$Ar \geq 372{,}9\,K_{F,\Delta\rho}^{0,275} \quad \text{mit} \quad Re_P = K_{F,\Delta\rho}^{0,15}\left(4{,}18\,Ar^{0,281}\,K_{F,\Delta\rho}^{-0,0773} - 0{,}75\right) \tag{3-21}$$

3.6 Experimentelle Durchführung

Die in Abschnitt 4.2 durchgeführten Wachstumsversuche der Stämme Showa und Bot22 zur Identifizierung geeigneter *Botryococcus braunii* Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion erfolgten als Triplikate in 1,5 L Blasensäulenreaktoren (Abschnitt 3.2.3) auf BG11-Standardmedium (Abschnitt 3.2.2.1). Die Versuche wurden bei konstanter Beleuchtung und einer Temperatur von 26 °C durchgeführt. Die Blasensäulen-Reaktoren wurden mit einer Biomassekonzentration von 0,2 bis 0,3 g L^{-1} angeimpft und über 21 Tage alle 2 bzw. 3 Tage beprobt. Die Datensätze zur Kultivierung der Stämme SAG 30.81, SAG 807-1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K-1489, SCCAP K-1761 und CCALA 779 resultierten aus vorangegangen Untersuchungen (Kleinert 2014). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte unter dem Aspekt der Eignung für das Verfahren der *in situ*-Extraktion die Betrachtung und Darstellung aller in Tabelle 3-1 aufgeführten *Botryococcus* Stämme.

Die Kultivierung der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 für die Versuche zur Ermittlung der optimalen Extraktionszeit (Abschnitt 4.4) erfolgte mit BG11-Standardmedium in 3 L Blasensäulen-Reaktoren (Abschnitt 3.2.3) und angeschlossener glatter Extraktionseinheit (Abbildung 4-12). Zur Ermittlung der optimalen Extraktionszeit wurden zunächst Experimente über 7 Tage als Triplikate bei zwei unterschiedlichen Startbiomassekonzentrationen von 1,5 g_X L^{-1} und 2,5 g_X L^{-1} durchgeführt. Hierfür wurden beide Stämme mit einer täglichen Extraktionszeit von 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 min der *in situ*-Extraktion (Lösungsmittel *n*-Hexan) unterzogen. Anschließend erfolgte bei gleichen Kultivierungsbedingungen eine *in situ*-Extraktion über 30 Tage in Triplikaten unter der für den jeweiligen Stamm optimalen Extraktionszeit von 300 min für den Stamm Showa und 200 min für den Stamm Bot22. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 26 °C durchgeführt.

Für das Scale-up des Verfahrens der *in situ*-Extraktion (Abschnitt 4.5) wurden zunächst Wachstumsversuche in Triplikaten der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 auf BG11-Standardmedium über 35 Tage in 6,0 L FPA-Reaktoren und über 28 Tage in 1,5 L Blasensäulen durchgeführt. Zur Ermittlung des optimalen Düsendurchmessers wurden die beiden Stämme mit einer Startbiomassekonzentration von 2,5 g_X L^{-1} in Triplikaten angesetzt und bei Düsendurchmessern von 5, 4, 2 und 1 mm sowie optimaler Extraktionszahl über 10 Tage der *in situ*-Extraktion (Lösungsmittel n-Hexan) unterzogen. Anschließend erfolgte eine *in situ*-Extraktion unter optimaler Extraktionszahl und optimalem Düsendurchmesser über 45 Tage in Triplikaten. Im Rahmen dieser Versuche kamen vergleichend sowohl glatte, als auch auf Basis einer Vigreux-Kolonne angefertigte raue

Extraktionssäulen zum Einsatz. Die Versuche wurden mit konstanter Beleuchtung bei einer Temperatur von 26 °C durchgeführt.

Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen Temperatur, Nährstoffe und Hell/Dunkel-Zyklus (Abschnitt 4.6) erfolgte in unabhängigen Teilexperimenten als Triplikate in 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren über 28 Tage. Die Blasensäulen-Reaktoren wurden mit einer Biomassekonzentration von 0,2 bis 0,3 g L^{-1} angeimpft. Für die Optimierung der Kultivierungstemperatur wurden beide Stämme (Showa und Bot22) bei Temperaturen von 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 34 °C untersucht. Die Identifizierung der optimalen Beleuchtungszeit erfolgte anhand der Untersuchung der Hell/Dunkel-Zyklen 12/12, 16/08, 20/04 und 24/00. Die Durchführung der Experimente zum Einfluss der Nährmedienkomponenten erfolgte durch Variation der Nitrat-, Phosphat-, Magnesium-, Calcium und Eisenkonzentration im Nährmedium (Abschnitt 3.2.2.2 und Tabelle 3-3). Abschließend wurden die optimierten Kultivierungsbedingungen zusammengeführt und vergleichend zu einer Kontrollkultur (BG11-Standardmedium; H/D = 24/00; T = 26 °C) untersucht.

Die in Abschnitt 4.7 durchgeführte *in situ*-Extraktion des *Botryococcus braunii* Stammes Showa unter Zusammenführung aller Optimierungen über 80 Tage erfolgte als Duplikat. Die Kultivierung wurde in 6,0 L FPA-Reaktoren mit einer Startbiomassekonzentration von 2,5 g_X L^{-1} unter Verwendung des optimierten BG11-Nährmediums (Tabelle 3-4), einer als optimal ermittelten Temperatur von 28 °C und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 durchgeführt. Für die *in situ*-Extraktion wurden die auf Basis einer Vigreux-Kolonne ausgelegten rauen Extraktionssäulen verwendet. Die Extraktion erfolgte mit der als optimal ermittelten Extraktionskennzahl $\mathrm{At}_{\mathrm{EXT,eff}} = 464{,}24$ m^2 s L_{Susp}^{-1} bei einem Düsendurchmesser von 2 mm und einer täglichen Extraktionszeit von 672 min.

Alle Experimente wurden mit einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (LED-Panel, 80 W, 6500 K) und einer volumetrischen Begasungsrate von 1 vvm (1% CO_2) durchgeführt.

3.7 Rangliste zur Identifizierung geeigneter *Botryococcus braunii* Stämme

Für die Bewertung der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme hinsichtlich der Eignung für das Verfahren der *in situ*-Extraktion wurde eine Rangliste erstellt, welche auf den durchgeführten Wachstumsexperimenten basiert (Kleinert and Griehl 2021). Die zur Erstellung dieser Rangliste genutzten Parameter sind in Tabelle 3-7 dargestellt. Die Parameter der maximalen Biomasseproduktivität ($P_{X,max}$), Lipidproduktivität (P_L), Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe (P_{EKW}), Konzentration an extrahierbaren extrazellulären Kohlenwasserstoffen ($c_{EKW,EXT}$) und Lösungsmittelkompatibilität (SC) wurden mit Werten zwischen 1 und 10 Ranglistenpunkten (RP) bewertet. Die Parameter der maximalen Biomassekonzentration ($c_{X,max}$), des maximalen Lipidgehalts ($c_{L,max}$), des maximalen Gehaltes extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ($c_{EKW,max}$) und des Nährstoffverbrauchs an Nitrat (U_N) und Phosphat (U_P) wurden mit Werten zwischen 1 und 5 Punkten (RP) bewertet. Aus der Summe der erreichten Punkte wurde eine Rangliste mit Bewertungen zwischen 10 und 75 Punkten erstellt, wobei die Eignung zur *in situ*-Extraktion mit steigender Punktezahl zunimmt.

Tabelle 3-7: Parameterklassifizierung für die Erstellung einer Rangliste geeigneter *Botryococcus braunii* Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion.

RP	$P_{X,max}$ [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{X,max}$ [g L^{-1}]	P_L [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{L,max}$ [%x]	P_{EKW} [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{EKW,max}$ [%x]	$c_{EKW,EXT}$ [%x]	SC [%$_{dO2}$]	U_N [g g$_x^{-1}$]	U_P [g g$_x^{-1}$]
1	>0.00	≥0.5	>0.00	≥50	≥0.005	≥10	>0.0	≥10	≥0.8	≥0.08
2	>0.02	>1.0	>0.02	>60	>0.010	>20	>0.5	>20	>0.6	>0.06
3	>0.03	>1.5	>0.03	>65	>0.015	>30	>1.5	>30	>0.4	>0.04
4	>0.04	>2.0	>0.04	>70	>0.020	>40	>2.0	>35	>0.2	>0.02
5	>0.05	>2.5	>0.05	>75	>0.025	>50	>2.5	>40	>0.0	>0.00
6	>0.06		>0.06		>0.030		>3.0	>45		
7	>0.07		>0.07		>0.035		>4.0	>50		
8	>0.08		>0.08		>0.040		>5.0	>55		
9	>0.09		>0.09		>0.045		>6.0	>65		
10	>0.10		>0.10		>0.050		>7.0	>75		

3.8 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel, Systat SigmaPlot und OriginPro. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit OriginPro realisiert. Vor der statistischen Auswertung wurden die ermittelten Datensätze mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung ($p > 0,05$) überprüft (OriginPro). Die Analyse auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse mit einer, zwei oder drei unabhängigen Variablen erfolgte unter Nutzung der entsprechenden Varianzanalyse (ANOVA) als einfaktorielle-, zweifaktorielle- oder dreifaktorielle-Varianzanalyse ($p < 0,05$) sowie der Anwendung des Post-hoc-Test nach Holm-Sidak zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte der jeweiligen Datensätze ($p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenetische Analyse der ITS2-Region bei *Botryococcus braunii*

Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft (Abschnitt 2.3.2), lassen sich die *Botryococcus braunii* Stämme der Races A, B und L bezüglich der Primär- und Sekundärstruktur der ITS2-Region in je zwei distinktive phylogenetische Gruppen (Clades) einordnen. Anhand der geringen Datenlage von verfügbaren Sequenzen der ITS2-Region (10 Eigenisolate und 23 Sequenzen aus NCBI), konnten Hegedűs et al. 2016 anhand von auftretenden CBCs und hCBCs keine Rückschlüsse bezüglich dieser Aufteilung ziehen. Aufbauend auf der bis zum jetzigen Zeitpunkt einzigen Veröffentlichung zur molekularphylogenetischen Untersuchung der Primär- und Sekundärstruktur der ITS2-Region von *Botryococcus braunii* durch Hegedűs et al. 2016, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Stämme untersucht. Dabei wurde die ITS2-Region von 13 *Botryococcus braunii* Stämmen sequenziert und mit 51 Sequenzen der NCBI Datenbank verglichen. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Erweiterung des Datensatzes des Vergleichs der ITS2-Region von *Botryococcus braunii* sollen weitere Erkenntnisse bezüglich der Aufteilung in je zwei Subclades der Races A, B und L gewonnen werden. Weiterführend wurden die klimatischen Bedingungen am Isolationsort der untersuchten Stämme betrachtet, um mögliche Ursachen für die Aufteilung der, anhand der chemischen Struktur der gebildeten Kohlenwasserstoffe definierten Races A, B und L, in je zwei Subclades zu erörtern.

4.1.1 Phylogenetische Analyse der Primärstruktur der Untersuchten ITS2-Sequenzen

Die phylogenetische Analyse der Primärstruktur der untersuchten *Botryococcus braunii* ITS2-Sequenzen wurde in Abbildung 4-1, in Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4 dargestellt. In Bezug auf die als Outgroup genutzten Sequenzen von *Choriocystis,* konnte eine eindeutige Abgrenzung der betrachteten *Botryococcus braunii* Stämme und eine Zuordnung der 64 untersuchten Sequenzen in ein Clade (*Botryococcus braunii*) festgestellt werden, was durch Bootstrap-Werte von 100 % der durchgeführten statistischen Verfahren ML, NJ, MP und MDMC bestätigt wurde. Innerhalb des Clades *Botryococcus braunii* konnten alle untersuchten *Botryococcus braunii* Sequenzen den Clades mit den Bezeichnungen A und BL zugeordnet werden (Abbildung 4-1). Dabei konnten 26 Stämme, darunter alle Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race A dem Clade mit der Bezeichnung A und alle anderen Stämme dem Clade mit der Bezeichnung BL zugeordnet werden. Die Zuordnung zu den Clades A und BL konnte durch hohe Bootstrap-Werte von 99, 96, 98 und 100 % für den Clade A und von 96,

97, 98 und 100 % für den Clade BL der statischen Verfahren ML, NJ, MP und MCMC bestätigt werden (Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4).

Betrachtet man die Zuordnung der untersuchten Stämme innerhalb des Clades A, konnte eine Aufteilung in zwei Subclades, welche mit A1 und A2 bezeichnet wurden, festgestellt werden. Mit Bootstrap-Unterstützungen von 98 %, 100 %, 99 % und 96 % für den Clade A1 und 97 %, 91 %, 100 % und 100 % für den Clade A2 der statistischen Verfahren ML, NJ, MP und MCMC, konnte die Zuordnung der Stämme des Clades A in die Subclades A1 und A2 bestätigt werden.

Analog zu den Stämmen des Clades A, konnten die Stämme des Clades BL ebenfalls zwei Subclades mit den Bezeichnungen B und L zugeordnet werden. Dabei konnten 19 Sequenzen, darunter alle Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race B dem Clade mit der Bezeichnung B und 19 Sequenzen, darunter alle Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race L dem Clade mit der Bezeichnung L zugeordnet werden. Diese Zuordnung wurde mit Bootstrapwerten von 86 %, 72 %, 62 % und 93 % für den Clade B und 98 %, 94 %, 98 %, 100 % für den Clade L der statistischen Verfahren ML, NJ, MP und MCMC ermittelt.

Für die Clades B und L wurde eine weitere Aufteilung in die Subclades mit den Bezeichnungen B1 und B2 für (Clade B) und in die Subclades mit den Bezeichnungen L1 und L2 (Clade L) ermittelt. Für die Subclades L1 und L2 konnte diese Aufteilung anhand hoher Bootstrap-Werte der statistischen Verfahren ML, NJ, MP und MCMC von 99 %, 98 %, 100 % und 80 % für Clade L2 und 87 %, 88 %, 70 % und 100 % für Clade L1 bestätigt werden. Die Bootstrap-Unterstützung für die Subclades B1 und B2 fielen mit Werten von 48, 75, 47, 100 % für Clade B1 und 67 %, 79 %, 63 % und 95 % für Clade B2 der statistischen Verfahren ML, NJ und MP und MCMC relativ gering aus.

Betrachtet man die ermittelten phylogenetischen Distanzen der Primärstruktur der untersuchten *Botryococcus braunii* ITS2-Sequenzen (Anhang Abbildung 1), dann konnte anhand des statistischen Verfahrens ML eine Distanz von 0,16 für den Clade A und von 0,29 für den Clade BL berechnet werden. Innerhalb des Clades A, wurde eine Distanz für die Stämme mit der Zuordnung zu Clade A1 von 0,08 und eine Distanz für die Stämme mit der Zuordnung zu Clade A2 von 0,16 ermittelt. Innerhalb des Clades A1 wiesen die Stämme eine phylogenetische Distanz ≤ 0,01 auf, wohingegen die Stämme mit der Zuordnung zu Clade A2 mit phylogenetischen Distanzen von 0,1 und 0,04 in zwei weitere Subclades zugeordnet werden konnten. Innerhalb dieser Subclades konnte eine Distanz der Stämme zueinander von ≤ 0,02 ermittelt werden. Innerhalb des Clades BL, wurde eine Distanz für die Stämme mit der Zuordnung zu Clade B von 0,12 und eine Distanz für die Stämme mit der Zuordnung zu Clade L von 0,3 ermittelt. Innerhalb des Clades B wiesen die Stämme des Subclades B1 eine phylogenetische Distanz von 0,05 und die Stämme des Subclades B2 eine phylogenetische

Distanz von 0,1 auf. Bei der weiteren Aufteilung der Stämme in diese Clades wurden phylogenetische Distanzen zwischen 0 und 0,26 ermittelt. Innerhalb des Clades L konnte für die Stämme des Subclades L1 eine phylogenetische Distanz von 0,14 und für die Stämme des Subclades L2 eine phylogenetische Distanz von 0,06 berechnet werden. Der Subclade L1 teilte sich dabei in zwei weitere Clades mit phylogenetischen Distanzen von 0,2 und 0,18 auf, wohingegen die Stämme des Clades L2 eine phylogenetische Distanz von ≤ 0,02 aufwiesen.

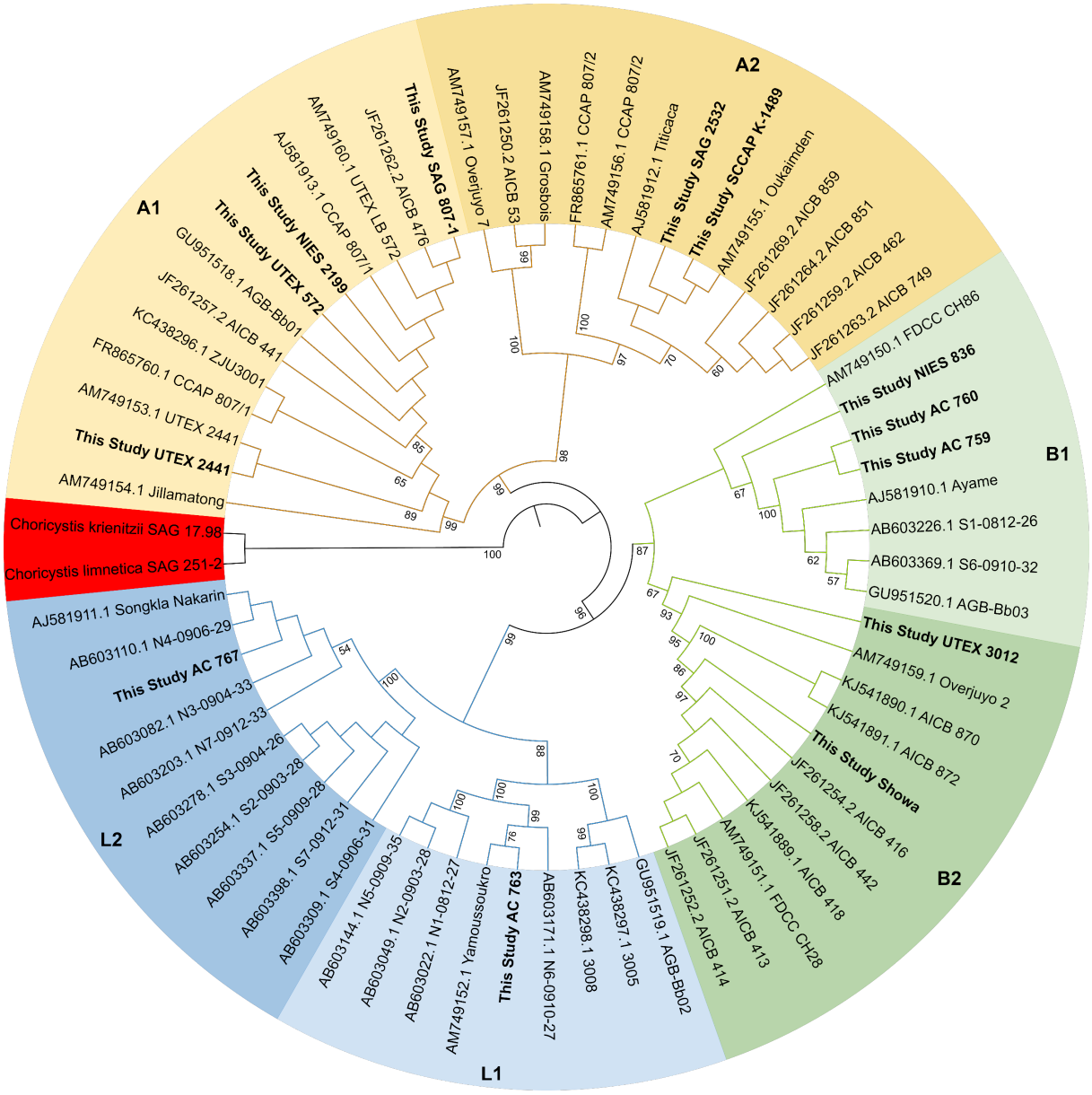


Abbildung 4-1: **Phylogenetische Analyse (Maximum Likelihood; GTR+G+I; 1000 Bootstraps; MEGA11) der primären Struktur der betrachteten *Botryococcus braunii* Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) rRNA Sequenzen (rot: Outgroup; gelb: Race A; grün: Race B; blau: Race L).**

4.1.2 Analyse der Sekundärstruktur der betrachteten ITS2-Sequenzen

Unter Integration der Sekundärstruktur der ITS2-Regionen konnte vergleichend zu der Zuordnung der Stämme anhand der primären ITS2-Struktur eine nahezu identische Eingruppierung in die Clades A, B und L sowie in die Subclades A1, A2, L1 und L2 festgestellt werden (Abbildung 4-2).

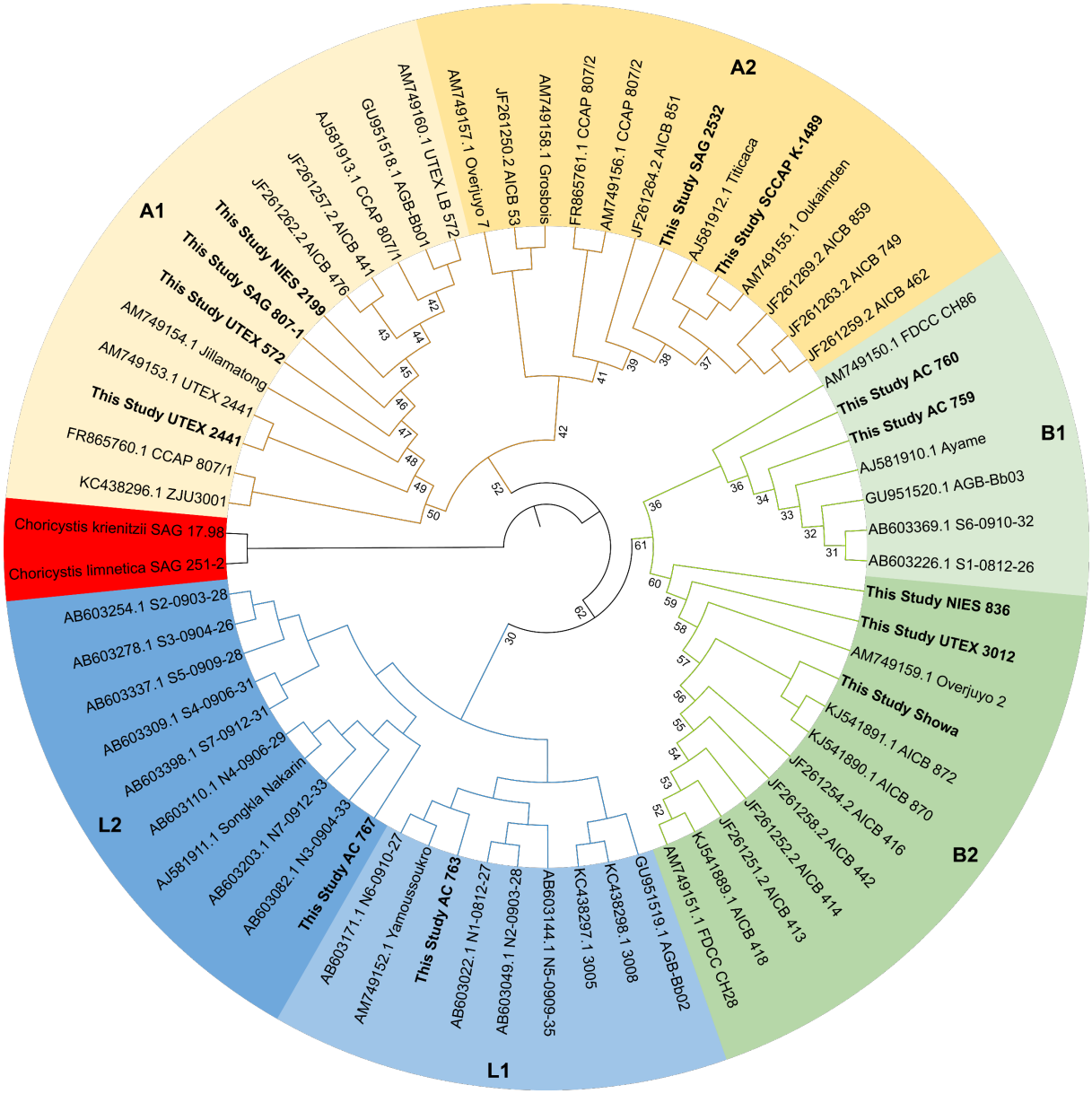


Abbildung 4-2: **Phylogenetische Analyse (Neighbor Joining; GTR; 1000 Bootstraps; ProfDist) der sekundären Struktur der betrachteten *Botryococcus braunii* Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) rRNA Sequenzen (rot: Outgroup; gelb: Race A; grün: Race B; blau: Race L).**

Bezüglich der als Outgroup genutzten Sequenzen von *Choriocystis,* konnte eine eindeutige Abgrenzung der 64 betrachteten *Botryococcus braunii* Sequenzen festgestellt werden. Innerhalb des Clades *Botryococcus braunii* konnten alle untersuchten *Botryococcus braunii* Sequenzen den Clades mit den Bezeichnungen A und BL zugeordnet werden. Es wurden 26 Stämme (alle Stämme der Race A) dem Clade mit der Bezeichnung A und alle anderen Stämme dem Clade BL zugeordnet. Die Bootstrap-Unterstützung des statistischen Verfahrens NJ (ProfDist) für die Zuordnung der Stämme zu Clade A betrug 52 % und für die Zuordnung zu Clade BL 63 % (Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4).

Betrachtet man die Zuordnung der untersuchten Stämme innerhalb des Clades A, konnte analog zur Primärstruktur eine Aufteilung in zwei Subclades, bezeichnet mit A1 (14 Sequenzen) und A2 (12 Sequenzen), festgestellt werden. Die Bootstrap-Unterstützung des statistischen Verfahrens NJ (ProfDist) betrug 51 % für den Clade A1 und 42 % für den Clade A2. Die Stämme des Clades BL wurden ebenfalls zwei Subclades mit den Bezeichnungen B (19 Sequenzen) und L (19 Sequenzen) zugeordnet. Alle Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race B wurden dabei dem Clade B und alle Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race L dem Clade mit der Bezeichnung L zugeordnet. Diese Zuordnung wurde mit Bootstrapwerten von 61 % für den Clade B und mit 31 % für den Clade L des statistischen Verfahren NJ (ProfDist) unterstützt.

Für die Clades B und L wurde eine weitere Aufteilung in die Subclades mit den Bezeichnungen B1 und B2 für (Clade B) und in die Subclades mit den Bezeichnungen L1 und L2 (Clade L) ermittelt. Dem Clade B1 wurden sieben Sequenzen mit einem Bootstrap-Wert von 37 % und dem Clade B2 12 Sequenzen mit einer Bootstrap-Unterstützung von 61 % zugeordnet. Im Vergleich zur Analyse der Primärstruktur konnte ein Wechsel des Stammes NIES 836 von Clade B1 in Clade B2 detektiert werden. Innerhalb des Clades L betrug die Bootstrap-Unterstützung für die Zuordnung zu den Subclades L1 und L2 unter 30 %.

Für die Ermittlung der Heterogenität der sekundären ITS2-Struktur der untersuchten Sequenzen und resultierenden Clades wurden die auftretenden Compensatory Base Changes (CBCs) analysiert (Tabelle 4-1 und Anhang Abbildung 2) und in Summe mit den auftretenden hemi-Compensatory Base Changes (hCBCs) in einer Matrix gegenüber gestellt (Anhang Abbildung 3). Zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede in den sekundären ITS2-Sequenzen wurde die Consensus-Sekundärstruktur der untersuchten Sequenzen in den ausgebildeten Clades A1, A2, B1, B2, L1 und L2 in Anhang Abbildung 4 gegenübergestellt. Betrachtet man die auftretenden CBCs zwischen den Sequenzen der Subclades A1 und A2 innerhalb des Clade A, dann konnten keine CBCs zwischen diesen Clades ermittelt werden. Innerhalb des Subclades A1 konnte eine CBC ermittelt werden, welche ausschließlich in Helix

IV auftrat. Zwischen den Sequenzen, welche dem Subclade A2 zugeordnet wurden, konnte entweder eine CBC festgestellt werden, welche an zwei unterschiedlichen Stellen auftreten kann (Position 102-207 bzw. 106-203), oder zwei CBCs, welche an den Positionen der einzel-CBCs auftraten. Für den Clade A2 treten die CBCs ausschließlich in Helix III auf.

Innerhalb des Clades B konnten zwischen den Sequenzen der Subclades B1 und B2 bis zu 3 CBCs ermittelt werden. Die ITS2-Sekundärstruktur der Stämme des Subclades B1 unterschieden sich mit Ausnahme des Stammes FDCC CH86 in keiner CBC. Der Stamm FDCC CH86 unterschied sich zu allen anderen Sequenzen des Subclades B1 in fünf CBCs wobei eine CBC in Helix I, eine in Helix II und drei CBCs in Helix III festgestellt werden konnten. Die Sekundärstruktur der Sequenzen des Subclade B2 unterschieden sich in bis zu drei CBCs in den Helices II, III und IV, wobei Stammunterschiede von einer, zwei oder drei auftretenden CBCs festzustellen waren. Für die in Clade L2 eingruppierten Stämme konnten keine CBCs ermittelt werden, wohingegen für die Stämme des Clade L1 entweder keine oder zwei CBCs in Helix III ermittelt wurden. Vergleicht man die Stämme des Clade A mit denen des Clade BL, dann konnten zwischen zwei und fünf CBCs ermittelt werden.

Tabelle 4-1: **Ausprägungen der Compensatory Base Changes (CBCs) in den ermittelten Clades A1, A2, B1, B2, L1, L2 der Sekundärstruktur der Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Sequenzen der analysierten *Botryococcus braunii* Stämme.**

Clade	CBC	Art der CBC	Helix	Position
A1	0	-	-	-
	1	AU – AGU	4	244 – 264
A2	0	-	-	-
	1	CU – AG	3	102 – 207
	1	CU – AG	3	106 – 203
	2	CU – AG	3	102 – 207
		CU – AG	3	106 – 203
B1	0	-	-	-
	5	CU – AG	1	13 – 20
		CU – AG	2	43 – 56
		AG – CU	3	85 – 189
		CU – AG	3	103 – 162
		CU – GU	3	105 – 160
B2	0	-	-	-
	1	AGU – CU-	2	45 – 62
	2	GCU – AGC	3	116 – 182
		AG – CU	3	137 – 149
	3	AGU – CU	2	45 – 62
		CU – AG	3	134 – 152
		GU – AC	4	213 – 229
L1	0	-	-	-
	2	AU – AU	3	98 – 190
		AC – GU	3	94 – 185
L2	0	-	-	-

Betrachtet man die Summe aus CBCs und hCBCs (Anhang Abbildung 3), unterschieden sich die Stämme des Clade L2 mit maximal einer CBC + hCBC und die Stämme des Clade A1 mit maximal zwei CBC + hCBCs am wenigsten. Die größte Heterogenität innerhalb eines Clades lässt sich für B2 mit bis zu neun CBC + hCBCs und für Clade L1 mit bis zu zehn CBC + hCBCs feststellen. Zwischen den Subclades unterscheiden sich die Clades L1 und B1 mit mindestens acht und bis zu 15 CBC + hCBCs am deutlichsten.

Betrachtet man die ITS2-Sekundärstrukur der Hauptclades A, B und L, dann konnten innerhalb des Clade A mindestens zwei und bis zu sechs CBC + hCBCs, innerhalb des Clade B bis zu 13 und innerhalb des Clade L bis zu zehn CBC + hCBCs detektiert werden. Untereinander treten zwischen A und B mindesten vier und bis zu zehn CBC + hCBCs, zwischen A und L mindestens sechs und bis zu 13 CBC + hCBCs und zwischen B und L mindestens vier und bis zu 15 CBC + hCBCs auf.

4.1.3 Betrachtung der klimatischen Bedingungen am Isolationsort der untersuchten ITS2-Sequenzen

Betrachtet man den Isolationsort und die an diesem Ort vorherrschenden klimatischen Bedingungen (Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4), dann konnte eine durchschnittliche Jahrestemperatur bei den Stämmen, welche sich dem Clade A zuordnen lassen, von 9,8 °C mit Jahrestiefstwerten von 2,6 °C und Jahreshöchsttemperaturen von 17,1 °C ermittelt werden. Für die Stämme des Subclades A1, welche in den klimatischen Bereichen Cfb (immerfeuchtes, warmgemäßigtes Klima mit warmen Sommern) und ET (Tundrenklima, kalte Klimate) zugeordnet werden konnten, beträgt die durchschnittliche Jahrestemperatur zwischen 7,8 und 12,7 °C bei Jahrestiefsttemperaturen zwischen -1,9 und 6,5 °C und Jahreshöchsttemperaturen zwischen 8,4 und 20,8 °C. Die Isolationsorte der Stämme des Subclades A2 konnten in die klimatischen Bereiche Cfa (immerfeuchtes, warmgemäßigtes Klima mit heißen Sommern), Cfb, Cwb (wintertrockenes warmgemäßigtes Klima mit warmen Sommern) und Dfb eingeordnet werden. Die Jahresdurchschnittstemperaturen liegen für die Stämme des Subclades A2 zwischen 8,6 und 12 °C bei Jahrestiefstwerten von -3,1 bis 6,4 °C und Jahreshöchstwerten zwischen 13,5 und 24 °C.

Für die Stämme, welche dem Clade BL zugeordnet werden konnten, beträgt die Jahresdurchschnittstemperatur im Mittel bei 18,4 °C und liegt damit ca. 9 K über der Temperatur am Isolationsort der Stämme des Clades A. Betrachtet man die Stämme des Clades B mit einer mittleren Jahresdurchschnittstemperatur von 15,4 °C, dann liegt die Temperatur am Isolationsort ca. 6 K über der Temperatur für die Stämme des Clades A und ca. 8,5 K unter der Jahresdurchschnittstemperatur der Stämme welche dem Clade L

zugeordnet werden konnten. Bezüglich der klimatischen Einordnung der Stämme des Clades B1 konnten die klimatischen Bereiche Am (tropisches Regenklima), Aw (tropisches Regenklima, wintertrocken), und Cfa ermittelt werden. Mit Ausnahme des Stammes AGB-Bb03 (17,7 °C) liegt die Jahresdurchschnittstemperatur des Isolationsortes der Stämme des Clades B1 zwischen 22,9 und 26,3 °C. Die Stämme mit Zugehörigkeit zum Clade B2 konnten den klimatischen Bereichen Csc (sommertrockene warmgemäßigte Klimate mit kurzen Sommern), Cfa, Cfb, Cwb und Dfb (wintertrockene warmgemäßigte Klimate mit warmen Sommern) zugeordnet werden. Die Jahresdurchschnittstemperatur des Isolationsortes der Stämme des Clade B konnte mit Werten von 8,9 bis 17,5 °C ermittelt werden und liegt im Durchschnitt (10,53 °C) ca. 13 K unter dem Jahresmittelwert der Stämme des Clades B1.

Die klimatischen Bereiche der Isolationsorte der Stämme mit Zugehörigkeit zu Clade L weisen von allen untersuchten Stämmen die höchste Jahresdurchschnittstemperatur auf. Diese liegt mit 23,6 °C ca. 8 K über der Temperatur der Stämme des Clades B und ca. 14 K über der Jahresdurchschnittstemperatur der Stämme des Clades A. Innerhalb des Clades L1 konnte eine Jahresdurchschnittstemperatur von 22,9 °C der Isolationsorte, welche sich in den klimatischen Bereichen Aw, Cfb und Cfa befinden, ermittelt werden. Mit Ausnahme des Stammes AGB-Bb02 (9,4 °C) fallen die durchschnittlichen Temperaturen in den kältesten Monaten in diesen klimatischen Bereichen nicht unter 17 °C, wobei die Höchsttemperaturen im Mittel über 26,3 °C liegen. Die Isolationsorte der Stämme des Clades L2 konnten den klimatischen Bereichen Am und Cfa zugeordnet werden. Die mittlere Jahrestemperatur liegt bei diesen Isolationsorten bei ca. 25 °C, wobei keine niedrigeren Temperaturen als 17,3 °C und keine höheren als 28 °C erreicht werden.

Tabelle 4-2: **Phylogenetische Analyse der primären und sekundären Strukturen der ITS2-Sequenzen und klimatische Einordnung der in die ermittelten Clades A, A1 und A2 zugeordneten *Botryococcus braunii* Stämme (Ermittlung der Klimadaten über climate-data.org)**

Clade	Primärstruktur						Sekundärstruktur				Klimatische Bedingungen am Isolationsort					
	ML	NJ	MP	MCMC	Stamm/ Isolat		NJ	Stamm/ Isolat		CBC Nr.	Isolationsort	Land	Klima	T [°C] Mittel	T [°C] Min.	T [°C] Max.
A	99	96	98	100			52			1 - 26				9,8	2,6	17,1
					SAG 807-1	This Study		SAG 807-1	This Study	1	Madingley	UK	Cfb	10,6	4,6	17,6
					UTEX 572	This Study		UTEX 572	This Study	2	Madingley	UK				
					UTEX 2441	This Study		UTEX 2441	This Study	3	Cuzco	PER	ET	7,8	6,5	8,4
					NIES 2199	This Study		NIES 2199	This Study	4	Madingley	UK	Cfb	10,6	4,6	17,6
					ZJU3001	KC438296.1		ZJU3001	KC438296.1	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
					AGB-Bb01	GU951518.1		AGB-Bb01	GU951518.1	6	Madingley	UK	Cfb	10,6	4,6	17,6
A1	98	100	99	96	UTEX 2441	AM749153.1	51	UTEX 2441	AM749153.1	7	Cuzco	PER	ET	7,8	6,5	8,4
					CCAP 807/1	AJ581913.1		CCAP 807/1	AJ581913.1	8	Madingley	UK		10,6	4,6	17,6
					UTEX 572	AM749160.1		UTEX 572	AM749160.1	9	Madingley	UK				
					Jillamatong	AM749154.1		Jillamatong	AM749154.1	10	Braidwood	AUS	Cfb	12,7	6,2	19,2
					CCAP 807/1	FR865760.1		CCAP 807/1	FR865760.1	11	Madingley	UK		10,6	4,6	17,6
					AICB 441	JF261257.2		AICB 441	JF261257.2	12	Turda	ROU		10,3	-0,7	20,8
					AICB 476	JF261262.2		AICB 476	JF261262.2	13	Ocna Sibiului	ROU		9,6	-1,9	20,1
					SCCAP K-1489	This Study		SCCAP1489	This Study	14	Nieuwpoort	BEL	Cfb	11,2	4,9	18,1
					SAG 2532	This Study		SAG 2532	This Study	15	Cuxhaven	GER	Cfb	10,1	2,7	17,9
					Overjuyo 7	AM749157.1		Overjuyo 7	AM749157.1	16	Overjuyo	BOL	Cwb	8,4	6,4	10,3
					CCAP 807/2	AM749156.1		CCAP 807/2	AM749156.1	17	Cumbria	UK	Cfb	7,5	2,4	13,5
					Titicaca	AJ581912.1		Titicaca	AJ581912.1	18	La Paz	PER	Cwb	8,4	6,4	10,3
					Grosbois	AM749158.1		Grosbois	AM749158.1	19	Grosbois	FRA	Cfb	10,4	1,9	19,2
A2	97	91	100	100	Oukaimden	AM749155.1	42	Oukaimden	AM749155.1	20	Oukaimden	MAR	Cfb	10,9	2,9	20,5
					CCAP 807/2	FR865761.1		CCAP 807/2	FR865761.1	21	Cumbria	UK	Cfb	7,5	2,4	13,5
					AICB 859	JF261269.2		AICB 859	JF261269.2	22	Tăureni		Cfb	9,9	-2,8	21,1
					AICB 851	JF261264.2		AICB 851	JF261264.2	23	Ţaga Mare		Dfb	9,3	-3,2	20,4
					AICB 749	JF261263.2		AICB 749	JF261263.2	24	Turda	ROU	Cfb	10,3	-0,7	20,8
					AICB 462	JF261259.2		AICB 462	JF261259.2	25	Turda		Cfa	12,0	-0,5	24,0
					AICB 53	JF261250.2		AICB 53	JF261250.2	26	Sălicea		Dfb	8,6	-3,1	19,2

Tabelle 4-3: **Phylogenetische Analyse der primären und sekundären Strukturen der ITS2-Sequenzen und klimatische Einordnung der in die ermittelten Clades BL, B, B1 und B2 zugeordneten *Botryococcus braunii* Stämme (Ermittlung der Klimadaten über climate-data.org).**

Clade	Primärstruktur						Sekundärstruktur				Klimatische Bedingungen am Isolationsort					
	ML	NJ	MP	MCMC	Stamm/ Isolat		NJ	Stamm/ Isolat		CBC Nr.	Isolationsort	Land	Klima	T [°C] Mittel	T [°C] Min.	T [°C] Max.
B/L	96	97	98	100			63			27-64				18,4	11,5	24,7
B	86	72	62	93			62			27-45				15,4	6,7	23,5
B1	48	75	47	100	AC 759	This Study	37	AC 759	This Study	27	Ayamé	CIV	Am	25,9	24,1	27,2
					AC 760	This Study		AC 760	This Study	28	Kossou	CIV	Aw	26,3	24,8	28,2
					FDCCCH86	AM749150.1		FDCCCH86	AM749150.1	29	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
					AGB-Bb03	GU951520.1		AGB-Bb03	GU951520.1	30	WuHan	CHN	Cfa	17,7	4,8	29,2
					S6-0910-32	AB603369.1		S6-0910-32	AB603369.1	31	Okinawa	JPN		22,9	17,3	28,0
					Ayame	AJ581910.1		Ayame	AJ581910.1	32	Ayamé	CIV	Am	25,9	24,1	27,2
					S1-0812-26	AB603226.1		S1-0812-26	AB603226.1	33	Okinawa	JPN	Cfa	22,9	17,3	28,0
					NIES 836	This Study										
B2	67	79	63	95	Showa	This Study	61	Showa	This Study	34	Berkley	USA	Csc	14,1	9,2	18,4
								NIES 836	This Study	35	Imutaike	JPN	Cfa	17,5	8,3	27,0
					UTEX 3012	This Study		UTEX 3012	This Study	36	Ontonagon	USA	Dfb	5,9	-8,7	20,0
					AICB 872	KJ541891.1		AICB 872	KJ541891.1	37	Tăureni		Cfb	9,9	-2,8	21,1
					AICB 870	KJ541890.1		AICB 870	KJ541890.1	38	Crestur	ROU	Cfa	11,5	-0,3	22,3
					AICB 418	KJ541889.1		AICB 418	KJ541889.1	39	Mărtineşti			12,0	-1,0	24,2
					FDCCCH28	AM749151.1		FDCCCH28	AM749151.1	40	Itasca	USA	Dfb	5,1	-12,4	21,0
					Overjuyo 2	AM749159.1		Overjuyo 2	AM749159.1	41	La Paz	PER	Cwb	8,4	6,4	10,3
					AICB 442	JF261258.2		AICB 442	JF261258.2	42	Mărtineşti					
					AICB 416	JF261254.2		AICB 416	JF261254.2	43	Mărtineşti	ROU	Cfa	12,0	-1,0	24,2
					AICB 414	JF261252.2		AICB 414	JF261252.2	44	Mărtineşti					
					AICB 413	JF261251.2		AICB 413	JF261251.2	45	Cheile Turului		Cfb	8,9	-2,9	19,7

Tabelle 4-4: **Phylogenetische Analyse der primären und sekundären Strukturen der ITS2-Sequenzen und klimatische Einordnung der in die ermittelten Clades L, L1 und L2 zugeordneten *Botryococcus braunii* Stämme (Ermittlung der Klimadaten über climate-data.org).**

Clade	Primärstruktur						Sekundärstruktur				Klimatische Bedingungen am Isolationsort					
	ML	NJ	MP	MCMC	Stamm/ Isolat		NJ	Stamm/ Isolat		CBC Nr.	Isolationsort	Land	Klima	T [°C] Mittel	T [°C] Min.	T [°C] Max.
L	98	94	98	100			31			46-64				23,8	20,0	26,9
L1	87	88	70	100	AC 763	This Study	<30	AC 763	This Study	46	Martinique	FRA	Aw	25,3	24,0	26,3
					Yamoussoukro	AM749152.1		Yamoussoukro	AM749152.1	47	Yamoussoukro	CIV		26,3	24,7	28,1
					3008	KC438298.1		3008	KC438298.1	48	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
					3005	KC438298.1		3005	KC438298.1	49	Hainan	CHN	Aw	24,5	18,5	28,3
					AGB-Bb02	GU951519.1		AGB-Bb02	GU951519.1	50	YuXi	CHN	Cfb	15,6	9,4	19,6
					N6-0910-27	AB603171.1		N6-0910-27	AB603171.1	51						
					N5-0909-35	AB603144.1		N5-0909-35	AB603144.1	52	Okinawa	JPN	Cfa	22,9	17,3	28,0
					N2-0903-28	AB603049.1		N2-0903-28	AB603049.1	53						
					N1-0812-27	AB603022.1		N1-0812-27	AB603022.1	54						
L2	99	98	100	88	AC 767	This Study	<30	AC 767	This Study	55	Songla	THA	Am	26,8	25,6	27,7
					S7-0912-31	AB603398.1		S7-0912-31	AB603398.1	56						
					S5-0909-28	AB603337.1		S5-0909-28	AB603337.1	57						
					S4-0906-31	AB603309.1		S4-0906-31	AB603309.1	58	Okinawa	JPN	Cfa	22,9	17,3	28,0
					S3-0904-26	AB603278.1		S3-0904-26	AB603278.1	59						
					S2-0903-28	AB603254.1		S2-0903-28	AB603254.1	60						
					Songkla	AJ581911.1		Songkla	AJ581911.1	61	Songla	THA	Am	26,8	25,6	27,7
					N7-0912-33	AB603203.1		N7-0912-33	AB603203.1	62	Okinawa	JPN	Cfa	22,9	17,3	28,0

4.2 Identifizierung von geeigneten *Botryococcus braunii* Stämmen für das Verfahren der *in situ*-Extraktion

In Bezug auf den in Abschnitt 2 dargestellten Stand der Wissenschaft wurden aktuell nur wenige *Botryococcus braunii* Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion untersucht. Aus den zur Verfügung stehenden Literaturdaten lassen sich keine Aussagen treffen, inwieweit sich die untersuchten Stämme für das Verfahren der in situ-Extraktion eignen, da bis auf wenige Ausnahmen nur das Wachstums und die Kohlenwasserstoffbildung betrachtet wurden. Für Parameter, wie die Lösungsmitteltoleranz der jeweiligen Stämme oder die Extrahierbarkeit der extrazellulären Kohlenwasserstoffe über Flüssig-Flüssig-Extraktion, welche für das Verfahren der *in situ*-Extraktion ausschlaggebend sind, wurden anhand der Literatur nur in geringen Maß und für nur wenige Stämme untersucht. Für die Identifizierung potenzieller *Botryococcus braunii* Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion wurden im Rahmen dieser Arbeit 12 verschiede *Botryococcus braunii* Stämme (Tabelle 3-1) hinsichtlich des Wachstums, der Bildung von Lipiden und extrazellulären Kohlenwasserstoffen, der Lösungsmitteltoleranz und des Nährstoffverbrauchs betrachtet. Die Auswahl der untersuchten Stämme erfolgte bezogen auf Wachstum und *in situ*-Extraktion anhand der zum Versuchszeitpunkt verfügbaren Literatur sowie zu der diesem Zeitpunkt in Stammsammlung verfügbaren Kulturen. Die Bewertung der untersuchten Stämme bezüglich der Eignung zur Gewinnung der Kohlenwasserstoffe mittels des *in situ*-Extraktionsverfahrens erfolgte auf Basis einer Rangliste, die hierfür entwickelt wurde und alle wichtigen Einflussparameter berücksichtigt (Abschnitt 3.6). Diese Ergebnisse wurden im Journal of Applied Phycology unter dem Titel „Identification of suitable *Botryococcus braunii* strains for non-destructive *in situ* hydrocarbon extraction“ im Jahr 2021 publiziert.

4.2.1 Wachstum und Nährstoffverbrauch

Die Ergebnisse für das Wachstum und den Nährstoffverbrauch der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme (Abbildung 4-3) über 21 Tage Kultivierung sind in Abbildung 4-4 und Tabelle 4-5 dargestellt. Die höchste Biomassekonzentration wurde für die Stämme Showa (2,905 ± 0,080 g L^{-1}) und Bot22 (2,634 ± 0,100 g L^{-1}) gemessen. Bei der Biomassekonzentration dieser beiden Stämme konnte ein signifikanter Unterschied zu den anderen untersuchten Stämmen festgestellt werden (ANOVA, $F_{11,14} = 286,44$, $p < 0,001$/Holm-Sidak, $t \geq 3,438$, $p < 0,05$). Die ermittelten Werte der beiden Stämme Showa und Bot22 lagen 92 bzw. 74 % über denen der restlichen Stämme. Mit 25 % der Biomassekonzentration des Stammes Showa wurde der niedrigste Wert für CCALA 779 (0,730 ± 0,010 g L^{-1}) detektiert.

Der Vergleich der maximalen Biomasseproduktivität zeigt, dass die höchsten Werte für die Stämme Showa und Bot22 erzielt wurden (ANOVA, $F_{11,14} = 13{,}721$, $p < 0{,}001$/ Holm-Sidak, $t \geq 4{,}155$, $p < 0{,}05$). Für den Stamm Showa lag die Biomasseproduktivität verglichen mit den Stämmen Bot22, UTEX 2441 and SAG 30.81 um 11 % höher. Mit 0,042 ± 0,027 g L^{-1} d^{-1} und damit 80 % niedriger als die Biomasseproduktivität des Stammes Showa zeigte der Stamm CCALA 779 die niedrigste Biomasseproduktivität der untersuchten Stämme.

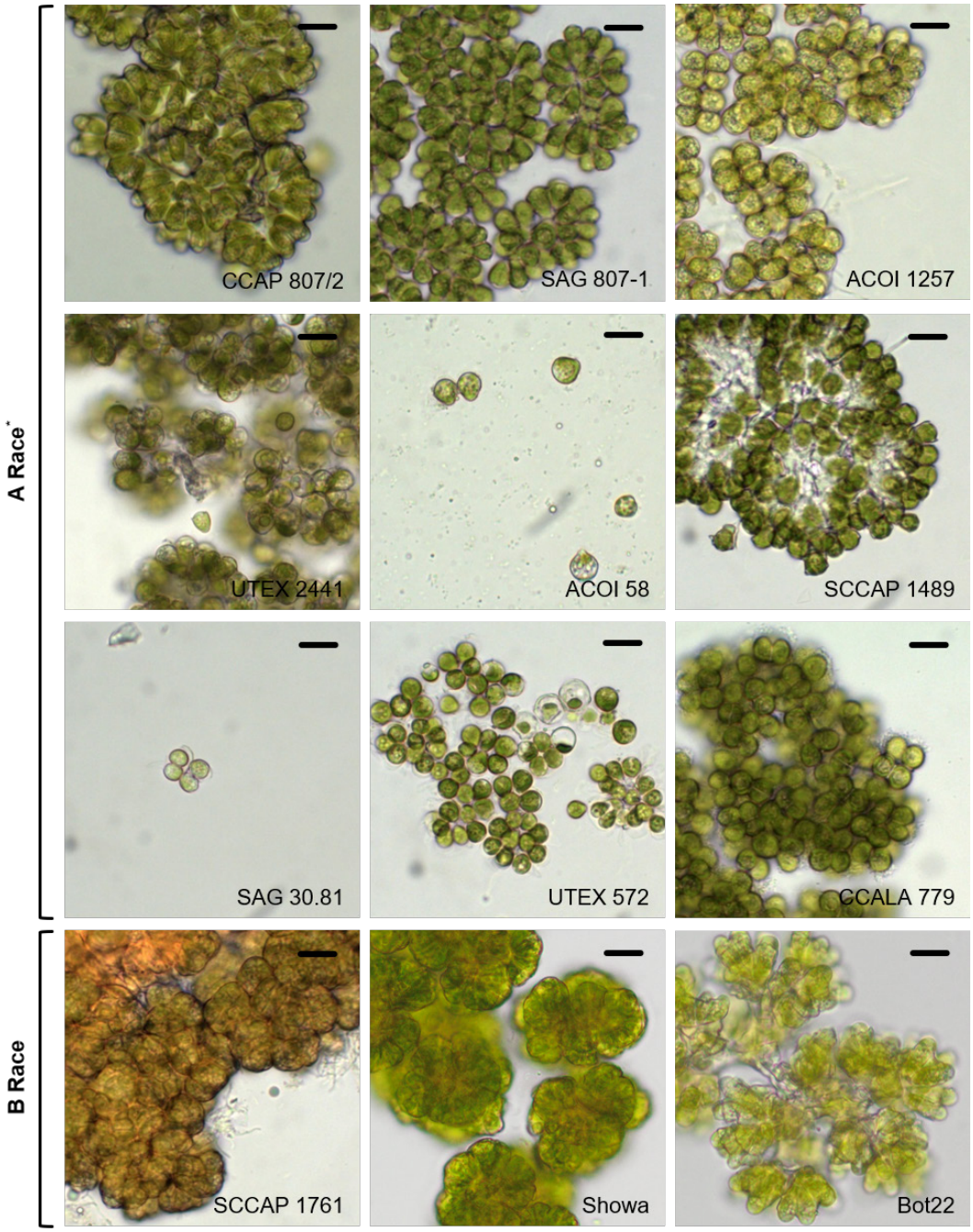


Abbildung 4-3: **Mikroskopische Aufnahme der untersuchten *Botryococcus* Stämme. Maßstab entspricht 10 µm.**

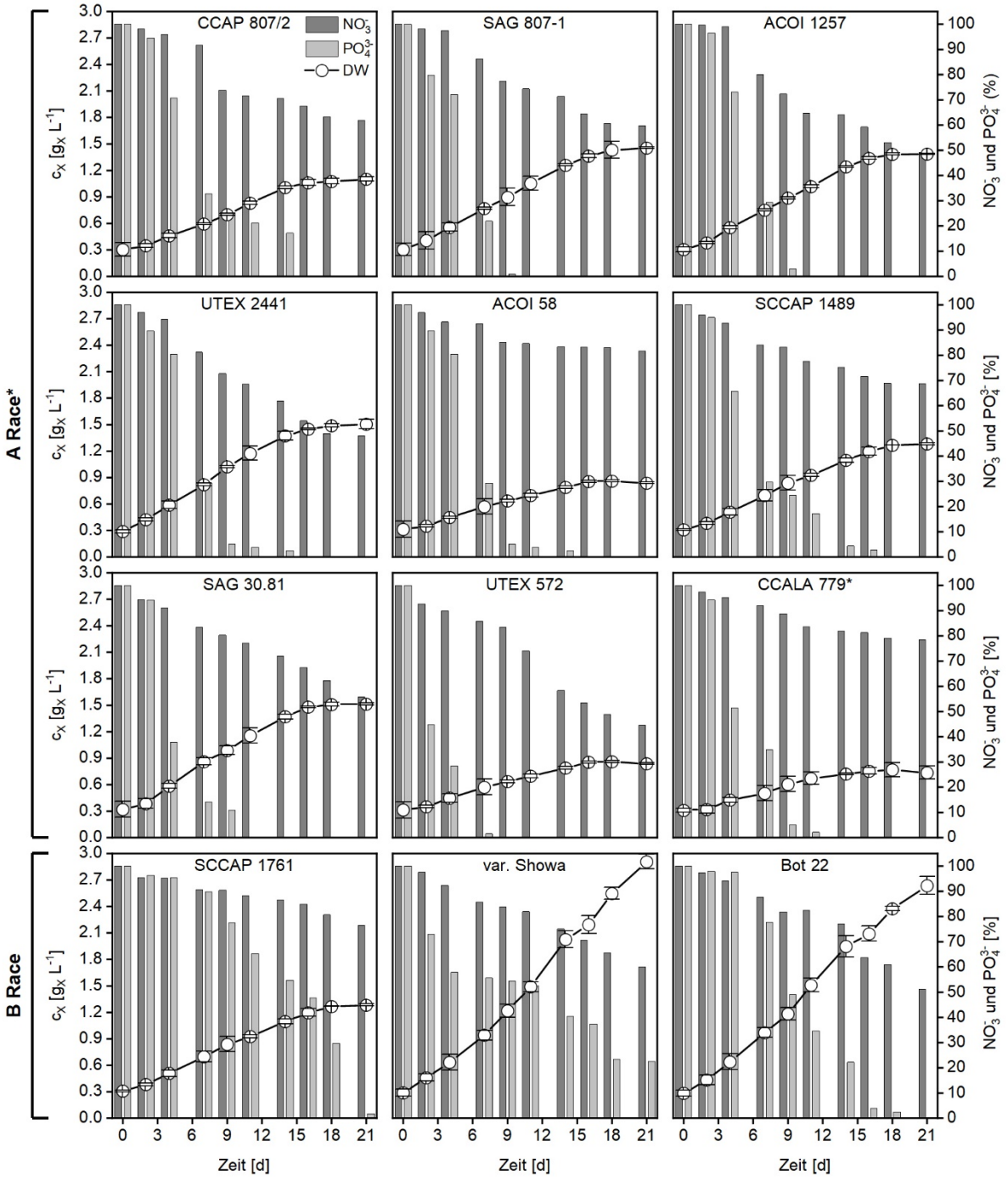


Abbildung 4-4: **Graphische Darstellung der Wachstumskurven und des Nährstoffverbrauchs für Nitrat und Phosphat der 12 betrachteten *Botryococcus braunii* Stämme (*Zuordnung einer Race für den Stamm CCALA 779 nicht verfügbar). Datensätze der Stämme SAG 30.81, SAG 807-1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K-1489, SCCAP K-1761 und CCALA 779 wurden in vorangegangen Untersuchungen (Kleinert 2014) erhoben (Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten resultierend aus 2 biologischen Replikaten) und gesamtheitlich mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen Showa und Bot22 ausgewertet und dargestellt. Darstellung der Ergebnisse für Showa und Bot22 als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Tabelle 4-5: Wachstumsparameter der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme nach 21 Tagen Kultivierung.

Stamm	$P_{X,max}$ [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{X,max}$ [g L^{-1}]	P_L [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{L,max}$ [%x]	P_{EKW} [g L^{-1} d^{-1}]	$c_{EKW,max}$ [%x]	U_N [mg L^{-1} d^{-1}]	U_P [mg L^{-1} d^{-1}]	U_N [g g$_x^{-1}$]	U_P [g g$_x^{-1}$]
CCAP 807/2	0,055 ± 0,018	1,099 ± 0,020	0,035 ± 0,004	67,09 ± 4,30	0,030 ± 0,002	39,9 ± 1,2	51,20 ± 2,30	2,23 ± 0,10	0,931 ± 0,030	0,041 ± 0,002
SAG 807-1	0,076 ±0,010	1,452 ± 0,080	0,052 ± 0,003	76,23 ± 2,70	0,015 ± 0,001	19,7 ± 0,7	39,04 ± 2,80	3,10 ± 0,17	0,514 ± 0,045	0,041 ± 0,003
ACOI 1257	0,076 ±0,014	1,384 ± 0,090	0,036 ± 0,001	58,56 ± 1,00	0,019 ± 0,002	25,2 ± 2,1	56,31 ± 4,10	4,49 ± 0,11	0,741 ± 0,021	0,059 ± 0,004
UTEX 2441	0,092 ±0,012	1,504 ± 0,050	0,060 ± 0,010	71,56 ± 9,90	0,015 ± 0,002	16,6 ± 1,5	47,85 ± 3,70	4,12 ± 0,28	0,520 ± 0,028	0,045 ± 0,004
ACOI 58	0,044 ±0,019	0,835 ± 0,090	0,029 ± 0,001	69,62 ± 0,40	0,011 ± 0,001	25,2 ± 1,1	21,07 ± 2,10	1,01 ± 0,09	0,479 ± 0,061	0,023 ± 0,001
SCCAP 1489	0,064 ±0,010	1,281 ± 0,010	0,041 ± 0,002	69,62 ± 2,40	0,011 ± 0,001	16,8 ± 0,4	28,55 ± 3,10	1,87 ± 0,02	0,446 ± 0,022	0,029 ± 0,003
SAG 30.81	0,090 ±0,014	1,511 ± 0,070	0,040 ± 0,001	57,66 ± 0,50	0,014 ± 0,002	15,3 ± 0,1	27,31 ± 2,90	2,96 ± 0,14	0,303 ± 0,023	0,033 ± 0,003
UTEX 572	0,067 ±0,018	1,112 ± 0,100	0,031 ± 0,004	57,66 ± 4,40	0,011 ± 0,001	16,1 ± 1,3	44,66 ± 3,60	5,31 ± 0,22	0,667 ± 0,020	0,079 ± 0,002
SCCAP 1761	0,047 ±0,016	1,040 ± 0,020	0,035 ± 0,002	79,92 ± 1,90	0,011 ± 0,002	23,1 ± 1,6	17,92 ± 1,40	2,15 ± 0,09	0,381 ± 0,034	0,046 ± 0,001
Showa	0,146 ±0,008	2,905 ± 0,080	0,116 ± 0,001	79,48 ± 1,30	0,072 ± 0,001	49,3 ± 1,4	24,67 ± 2,50	1,24 ± 0,01	0,190 ± 0,017	0,010 ± 0,002
Bot22	0,132 ±0,005	2,634 ± 0,100	0,081 ± 0,003	61,74 ± 2,80	0,068 ± 0,002	51,6 ± 1,9	34,16 ± 1,60	2,22 ± 0,04	0,345 ± 0,061	0,022 ± 0,002
CCALA 779	0,042 ±0,027	0,733 ± 0,010	0,026 ± 0,010	77,30 ± 6,10	0,007 ± 0,002	17,8 ± 3,2	18,58 ± 2,40	1,43 ± 0,05	0,442 ± 0,040	0,034 ± 0,002

Datensätze der Stämme SAG 30.81, SAG 807 1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K 1489, SCCAP K 1761 und CCALA 779 wurden in vorangegangen Untersuchungen (Kleinert 2014) erhoben (Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten resultierend aus 2 biologischen Replikaten) und gesamtheitlich mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen Showa und Bot22 ausgewertet und dargestellt. Darstellung der Ergebnisse für Showa und Bot22 als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).

Der während der durchgeführten Wachstumsversuche gemessene Nährstoffverbrauch der verschiedenen *Botryococcus braunii* Stämme ist in Abbildung 4-4 als Prozentwert der initialen Nährstoffkonzentration dargestellt. Wie dieser Abbildung zu entnehmen ist, reduziert sich dieser Wert für Nitrat als auch für Phosphat über die Dauer der Kultivierung bei allen Stämmen. Nach 21 Tagen Kultivierung lag die finale Nitratkonzentration bei allen Stämmen zwischen 45 % und 85 % der Startkonzentration. Der höchste Verbrauch an Nitrat konnte mit 50 % bis 65 % für die Stämme UTEX 572, UTEX 2441, ACOI 1257 und Bot22 gemessen werden. Der geringste Verbrauch an Nitrat nach 21 Tagen mit 80 % der Startkonzentration wurde für die Stämme CCALA 779, SCCAP 1761 and ACOI 58 detektiert. Die Nitratverbrauchsrate (Tabelle 4-5) war signifikant unterschiedlich bei allen untersuchten Stämmen (ANOVA, $F_{11,14} = 49{,}458$, $p < 0{,}001$) und erreichte Werte zwischen 17,92 ± 1,41 mg L^{-1} d^{-1} und 56.31 ± 4,1 mg L^{-1} d^{-1}. Die Stämme ACOI 1257, CCAP 807/2, UTEX 2441 und UTEX 572 zeigten Nitratverbrauchsraten, welche um das Zwei- bis Dreifache höher lagen als die der Stämme SCCAP 1761, CCALA 779, ACOI 58 und Showa. Bezogen auf die Biomasse im Kultivierungssystem konnte der geringste Nitratverbrauch für den Stamm Showa gemessen werden und war damit 80 % geringer als der höchste detektierte biomassebezogene Nitratverbrauch für den Stamm CCAP 807/2.

Mit Ausnahme der Stämme Showa und SCCAP 1761 konnte eine Reduzierung der Phosphatkonzentration in der Kultursuspension auf 0 % der initialen Phosphatkonzentration festgestellt werden. Für die Stämme UTEX 572, SAG 807-1, ACOI 1257, SAG 30.81 und CCALA 779 konnte bereits nach 9 Tagen Kultivierungszeit kein Phosphat im Kulturmedium mehr detektiert werden. Bei den anderen Stämmen konnte dieser Wert nach 11 bzw. 21 Tagen Kultivierungszeit ermittelt werden. Bei dem Vergleich der Phosphatverbrauchsraten wurde der höchste Wert bei dem Stamm UTEX 572 ermittelt. Dieser lag um das Dreifache höher als die Phosphatverbrauchsrate der Stämme ACOI 58, Showa, CCALA 779 and SCCAP 1489 (Tabelle 4-5). Bezogen auf die Biomassekonzentration konnte für den Phosphatverbrauch ein signifikanter Unterschied unter den untersuchten Stämmen festgestellt werden (ANOVA, $F_{11,14} = 118{,}415$, $p < 0{,}001$). Im Vergleich zu dem Stamm Showa mit 0,010 ± 0.002 $g_{Phosphat}$ g_{TS}^{-1} benötigte UTEX 572 ungefähr das Achtfache an Phosphat.

4.2.2 Lipide und extrazelluläre Kohlenwasserstoffe

Für den Gehalt an Gesamtlipiden konnte, wie aus Abbildung 4-5 ersichtlich wird, eine Zunahme vom Start der Kultivierung bis zum Ende der Kultivierung nach 21 Tagen detektiert werden. Ein maximaler Gesamtlipidgehalt von mehr als 56,66 ± 4,4 % der Biomasse wurde bei allen Stämmen gemessen (Tabelle 4-5). Das höchste Ergebnis an Gesamtlipiden mit fast 80 % der Biomasse wurde bei den Stämmen SCCAP 1761 und Showa ermittelt. Die Stämme

ACOI 58, SCCAP 1489, CCAP 807/2 und Bot22 erreichten ebenfalls sehr hohe Gesamtlipidgehalte mit Werten zwischen 58,56 ± 1,0 bis 69 ± 2.4 % der Biomasse. Der niedrigste Gehalt an Gesamtlipiden mit 57,66 ± 4,4 % der Biomasse aller untersuchten Stämme wurde für UTEX 572 und SAG 30.81 gemessen. Dieser Wert lag 27 % unter dem des Stammes SCCAP 1761, welcher den höchsten Gehalt an Gesamtlipiden aufwies.

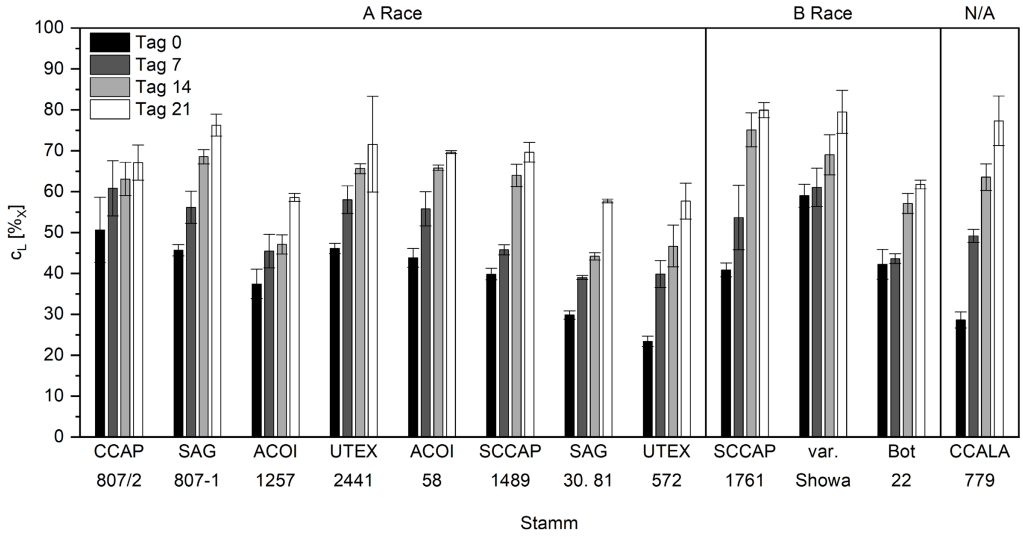


Abbildung 4-5: **Gesamtlipidgehalt der untersuchten *Botryococcus*-Stämme an Tag 0, 7, 14 und 21 über 21 Tage Kultivierung in 1,5 L Blasensäulen. Datensätze der Stämme SAG 30.81, SAG 807-1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K-1489, SCCAP K-1761 und CCALA 779 wurden in vorangegangen Untersuchungen (Kleinert 2014) erhoben (Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten resultierend aus 2 biologischen Replikaten) und gesamtheitlich mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen Showa und Bot22 ausgewertet und dargestellt. Darstellung der Ergebnisse für Showa und Bot22 als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Die höchste Gesamtlipidproduktivität mit 0,116 g L^{-1} d^{-1} konnte für den Stamm Showa ermittelt werden (Tabelle 4-5). Dieser Wert lag 30 % über dem des Stammes Bot22 mit der zweithöchsten Gesamtlipidproduktivität und unterschied sich signifikant von allen anderen Stämmen (ANOVA, $F_{11,14}$ = 95,576 $p < 0.001$/ Holm-Sidak, $t \geq 7.601$, $p < 0.05$). Die niedrigste Produktivität an Gesamtlipid wurde bei den Stämmen CCALA 779, ACOI 58 und UTEX 572 gemessen.

Für die Eignung zum Verfahren der *in situ*-Extraktion spielt der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen eine entscheidende Rolle. Im Vergleich zu allen anderen Stämmen erreichten die Stämme Bot22, Showa und CCAP 807/2 mit 51,6 ± 1,9, 49,3 ± 1,4 und 39,9 ± 1,2 % der Biomasse signifikant höhere Gehalte (ANOVA, $F_{11,14}$ = 173,591, $p < 0.001$/ Holm-Sidak, $t \geq 3,407$, $p < 0,05$). Diese Werte waren bis zu 65 % höher als die Konzentrationen an extrazellulären Kohlenwasserstoffen der Stämme SAG 30.81, UTEX 572,

CCALA 779, SCCAP 1489 and UTEX 2441. Die signifikant höchste Produktivität an extrazellulären Kohlenwasserstoffen wurde für den Stamm Showa ermittelt und lag 6 % über der Produktivität an extrazellulären Kohlenwasserstoffen des Stammes Bot22 (ANOVA, $F_{11,14}$ = 173,591, p < 0,001/Holm-Sidak, t ≥ 6,300, p < 0,05).

4.2.3 Lösungsmittelverträglichkeit

Im Vergleich zur lösungsmittelfreien Kontrollkultur zeigen alle eingesetzten Lösungsmittel (n-Hexan, n-Heptan, n-Octan) einen negativen Einfluss auf die Sauerstoffproduktion der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme. Die Verringerung der Sauerstoffproduktion war dabei abhängig von der Art des Lösungsmittels, der Kontaktzeit und von dem Stamm. (Abbildung 4-6). Mit zunehmender Kontaktzeit zwischen Lösungsmittel und Kultursuspension konnte ein signifikanter Rückgang der Sauerstoffproduktion verzeichnet werden (ANNOVA, $F_{1,70}$ = 16,6, p < 0,001).

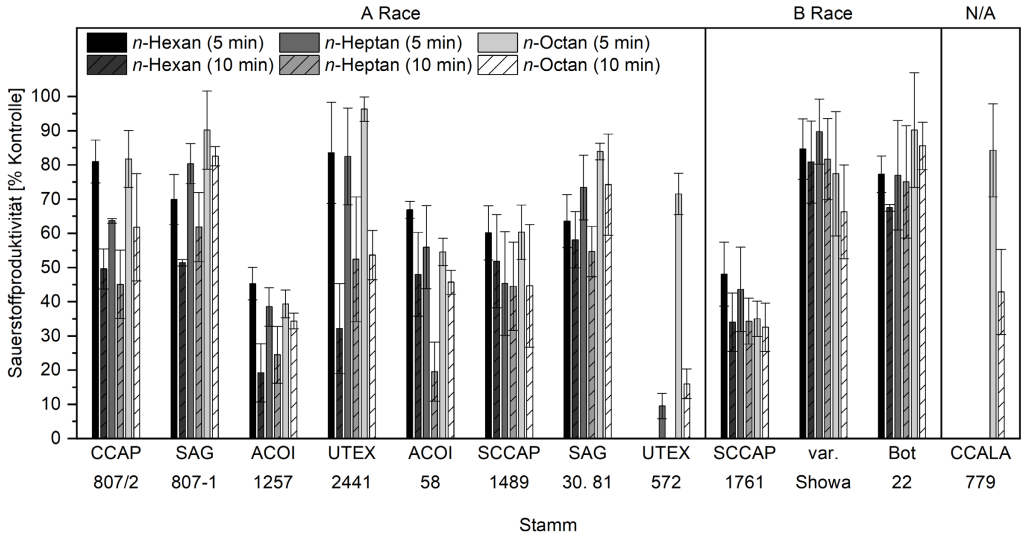


Abbildung 4-6: **Sauerstoffproduktion der untersuchten *Botryococcus*-Stämme nach fünf- bzw. zehnminütiger Behandlung mit *n*-Hexan, *n*-Heptan und *n*-Octan als Prozentsatz der Kontrollkultur ohne Lösungsmittelbehandlung. Datensätze der Stämme SAG 30.81, SAG 807-1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K-1489, SCCAP K-1761 und CCALA 779 wurden in vorangegangen Untersuchungen erhoben (Kleinert 2014) und gesamtheitlich im Rahmen dieser Arbeit unter Einbezug der Stämme Showa und Bot22 ausgewertet und dargestellt. Darstellung der Werte als Mittelwert ± SD (n = 3 technische Replikate).**

Im Allgemeinen konnte die höchste Kompatibilität zum Lösungsmittel mit über 75 % bei 5-minütiger und mit über 50 % der initialen Sauerstoffproduktion bei 10-minütiger Lösungsmittelbehandlung für die Stämme Bot22, SAG 807-1, UTEX 2441 and CCAP 807/2 ermittelt werden. Bei der Behandlung mit *n*-Octan über 10 Minuten wurde mit über 85 % der initialen Sauerstoffproduktion die höchste Lösungsmittelkompatibilität für die Stämme

SAG 807-1 und Bot22 bestimmt. Dahingegen konnte unter den gleichen Bedingungen bei den Stämmen CCALA 779, UTEX 572 und ACOI 1257 eine nur noch sehr geringe oder keine Sauerstoffproduktion mehr ermittelt werden. Es wird ersichtlich, dass *n*-Octan im Vergleich zu *n*-Heptan und *n*-Hexan die höchste Biokompatibilität aufweist. Der größte negative Einfluss auf die Kultursuspension bei steigender Kontaktzeit zum Lösungsmittel wurde für *n*-Hexan ermittelt. Für die Stämme CCAP 807/2 and UTEX 2441 konnte dabei eine Reduzierung der initialen Sauerstoffproduktion von 80,98 ± 6,24 auf 49,57 ± 5,89 % bzw. von 83,53 ± 14,77 auf 32,15 ± 13,14 % gemessen werden. Bei der Behandlung mit *n*-Heptan unter steigender Behandlungszeit wurde die höchste Abnahme der Sauerstoffproduktion für die Stämme UTEX 2441 (82,47 ± 14,17 auf 52,43 ± 18,25 %), ACOI 58 (55,96 ± 12,15 auf 19,53 ± 9,64 %) und SAG 807-1 (80,37 ± 5,83 auf 61,83 ± 10,10 %) ermittelt. Die Vitalität des Stammes UTEX 2441Mit wurde mit steigender Lösungsmittelkontaktzeit am stärksten beeinflusst, wohingegen die Stämme Showa und Bott22 am wenigsten beeinträchtigt wurden.

4.2.4 Extrahierbarkeit extrazellulärer Kohlenwasserstoffe

Ein wesentliches Kriterium für den Prozess der *in situ*-Extraktion stellt die Extrahierbarkeit der Kohlenwasserstoffe dar. Für die Ermittlung der Extrahierbarkeit wurden die untersuchten Stämme für 5 bzw. 10 Minuten mit den Lösungsmitteln *n*-Hexan, *n*-Heptan und *n*-Octan behandelt und der Gehalt an Kohlenwasserstoffen im Lösungsmittel ermittelt (Abbildung 4-7).

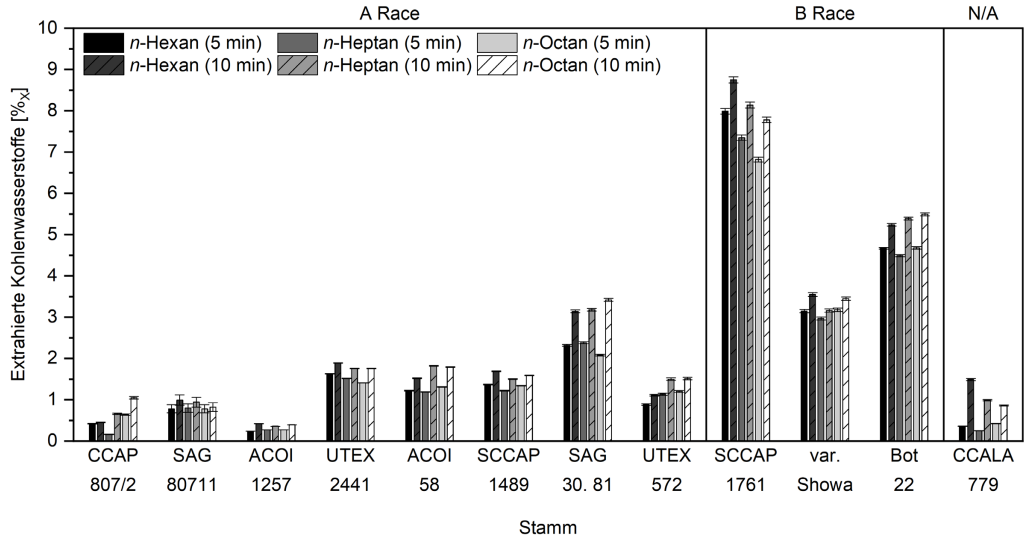


Abbildung 4-7: Extrahierten Kohlenwasserstoffe nach 5- bzw. 10-minütiger Lösungsmittelbehandlung (*n*-Hexan, *n*-Heptan und *n*-Octan) als Prozentsatz der Biotrockenmassekonzentration. Datensätze der Stämme SAG 30.81, SAG 807-1, UTEX 572, UTEX 2441, CCAP 807/2, ACOI 58, ACOI 1257, SCCAP K-1489, SCCAP K-1761 und CCALA 779 aus (Kleinert 2014). Gesamtheitliche Darstellung unter Einbezug der Stämme Showa und Bot22 Darstellung der Werte als Mittelwert ± SD (n = 3 technische Replikate).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Extraktion von Kohlenwasserstoffen bei allen Stämmen erreicht wurde. Mit steigender Extraktionszeit konnte ein signifikant höherer Gehalt an extrahierten Kohlenwasserstoffen detektiert werden (ANOVA, $F_{1,70}$ = 2310,075, P < 0,001). Beim Einfluss des Lösungsmittels auf die Extrahierbarkeit der Kohlenwasserstoffe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ANOVA, $F_{2,33}$ = 0,0109, p = 0,989). Der höchste Gehalt an extrahierbaren Kohlenwasserstoffen wurde für die B-Race Stämme SCCAP 1761 (8,75 ± 0,075 $\%_X$), Showa (5,49 ± 0,033 $\%_X$) und Bot22 (3,55 ± 0,045 $\%_X$) gemessen. Im Vergleich dazu konnten bei den A-Race Stämmen ACOI 1257, CCAP 807/2, SAG 807/2 und UTEX 572 nur zwischen 0,5 und 1,5 $\%_X$ Kohlenwasserstoffe extrahiert werden.

4.2.5 Ranking

Für den Vergleich zur Eignung der untersuchten *Botryococcus*-Stämme wurden die Ergebnisse aus den Abschnitten 4.2.1 bis 4.2.4 gewichtet (Abschnitt 3.6) und ein Ranking mit einer zu erreichenden Maximalpunktzahl von 75 erstellt. Wie aus Tabelle 4-6 zu entnehmen ist, erwiesen sich die Stämme Showa (71 Punkte) und Bot22 (64 Punkte) als am besten geeignet für das Verfahren der *in situ*-Extraktion. Im Vergleich zur niedrigeren Konzentration an Gesamtlipiden bei dem Stamm Showa, konnte für Bot22 eine höhere Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe detektiert werden. Die aus dieser Rangliste hervorgehenden Stämme UTEX 572 (22 Punkte) und CCALA 779 (25 Punkte) scheinen weniger gut geeignet für das Verfahren der *in situ*-Extraktion.

Tabelle 4-6: Rangliste der untersuchten *Botryococcus*-Stämme für die Eignung zur *in situ*-Extraktion.

Stamm	$P_{X,max}$	$c_{X,max}$	P_L	$c_{L,max}$	P_{EKW}	$c_{EKW,max}$	$c_{EKW,EXT}$	SC	U_N	U_P	Σ
CCAP 807/2	2	5	3	3	5	3	2	8	1	3	**35**
SAG 807-1	2	7	5	5	2	1	2	9	3	3	**39**
ACOI 1257	2	7	1	3	3	2	1	3	2	3	**27**
UTEX 2441	3	9	4	5	2	1	3	9	3	3	**42**
ACOI 58	1	4	3	2	2	2	2	6	3	4	**29**
SCCAP 1489	2	6	3	4	2	1	2	7	3	4	**34**
SAG 30.81	3	9	1	3	2	1	5	9	4	4	**41**
UTEX 572	2	6	1	3	2	1	2	1	2	2	**22**
SCCAP 1761	2	4	5	3	2	2	10	4	4	3	**39**
Showa	5	10	5	10	10	4	7	10	5	5	**71**
Bot22	5	10	2	8	10	5	6	10	4	4	**64**
CCALA 779	1	4	5	2	1	1	2	2	3	4	**25**

4.3 Mikroskopische Untersuchung der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22

Die Aufklärung der Synthesewege zur Kohlenwasserstoffbildung, die Mechanismen der Kohlenwasserstoffsekretion und der Ablauf der Koloniebildung bei *Botryococcus braunii* wurde basierend auf dem Stand der Wissenschaft (Abschnitt 2.3) zu großen Teilen mit dem B-Race Stamm Showa als Modellorganismus durchgeführt. Vergleichende Analysen zur Morphologie, zum Ablauf der Kohlenwasserstoffsekretion und zur Koloniebildung von Stämmen der gleichen Race sind in der Literatur kaum zu finden. Für die Identifizierung morphologischer Unterschiede der beiden B-Race *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22, welche in Abschnitt 4.2 als am geeignetsten für das Verfahren der *in situ*-Extraktion identifiziert werden konnten, wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen der Kolonien der beiden Stämme erstellt und über die Vermessung der einzelnen Zellen in der Kolonie die Zellgröße bestimmt. Weiterführend erfolgte die Ermittlung der Koloniegröße und Größenverteilung beider Stämme mit Hilfe einer FlowCam. Basierend auf den in Abschnitt 2.3.4 und Abschnitt 2.3.5 dargestellten wissenschaftlichen Erkenntnissen zur Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe und der Koloniebildung für den Stamm Showa, wurden für Bot22 lichtmikroskopische Aufnahmen zur Koloniebildung und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (NileRed) zur Nachverfolgung der Zellteilung und Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe erstellt. Die für diese Versuche genutzten Kultursuspensionen beider Stämme resultierten aus der Wachstumsphase.

4.3.1 Vergleich der morphologischen Eigenschaften

Über die Vermessung der einzelnen Zellen in den Kolonien der beiden Stämme Showa und Bot22 konnte für Showa eine durchschnittliche Zellgröße von 8,11 ± 1,84 µm (n = 1000) und für Bot22 eine durchschnittliche Zellgröße von 7,77 ± 4,32 µm (n = 1000) ermittelt werden. Die minimalen und maximalen Zellgrößen beider Stämme lagen für Showa bei 4,63 bzw. 12,59 µm und für Bot22 bei 3,77 bzw. 17,05 µm. Für die durchschnittliche Zellgröße konnte aufgrund der Schwankungsbreite der Zellgröße zum Mittelwert mit 22,6 % für den Stamm Showa und mit 55,5 % für den Stamm Bot22 kein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Zellgröße ermittelt werden (ANOVA, $F_{1199,2000} = 0,847$, $p = 0,358$).

Betrachtet man die Ausprägung der Kolonien der beiden Stämme Showa und Bot22 (Abbildung 4-8) lässt sich feststellen, dass die Kolonien des Stammes Showa im Vergleich zu denen des Stammes Bot22 wesentlich kompakter ausgeprägt sind. Beim Stamm Showa liegen die einzelnen Zellen in der Kolonie sehr eng zusammen, wobei die einzelnen Zellen in der Kolonie beim Stamm Bot22 weiter auseinander liegen. Zudem lassen sich flache Kohlenwasserstoffschichten erkennen, welche den basalen Bereich der einzelnen Zellen und

bei Zellteilung, den basalen Bereich der beiden Tochterzellen umgeben. Darüber hinaus lassen sich Verbindungen der einzelnen Zellen und Tochterzellkomplexe zu benachbarten Zellen und Tochterzellkomplexen feststellen.

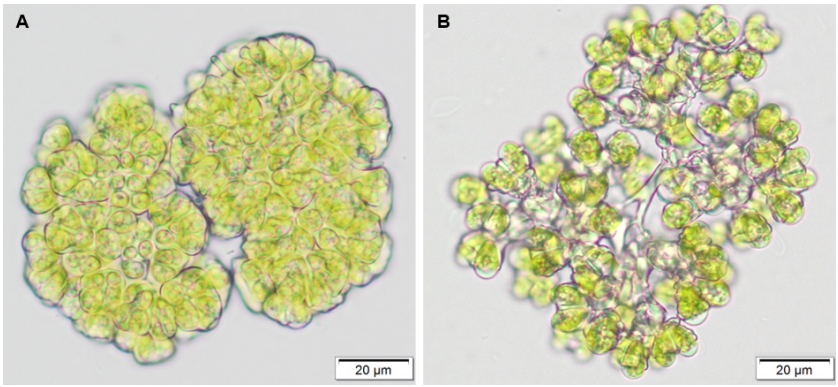


Abbildung 4-8: Mikroskopische Aufnahme der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme Showa (A) und Bot22 (B).

Bei der Ermittlung des Koloniedurchmessers (Abbildung 4-9) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen Showa und Bot22 festgestellt werden (ANOVA, $F_{99998,99999} = 171821$, $p < 0,05$). Die Kolonien des Stammes Showa weisen einen durchschnittlichen Durchmesser von 75,07 ± 22,35 µm auf, wohingegen die Kolonien des Stammes Bot22 mit durchschnittlich 236,58 ± 84,21 µm ca. 3-mal so groß sind. Die minimalen und maximalen Koloniedurchmesser beider Stämme lagen für Showa zwischen 12,68 und 124,74 µm und für Bot22 zwischen 10,89 und 420,45 µm. Betrachtet man die Verteilung des Koloniedurchmessers in der Kultursuspension (Abbildung 4-9), lag der Durchmesser der meisten Kolonien (Anteil > 1 %) bei dem Stamm Showa zwischen 48,54 und 77,35 µm. Bei dem Stamm Bot22 konnte für einen Anteil > 1 % an der Kultursuspension ein Koloniedurchmesser zwischen 181,79 und 379,20 µm detektiert werden.

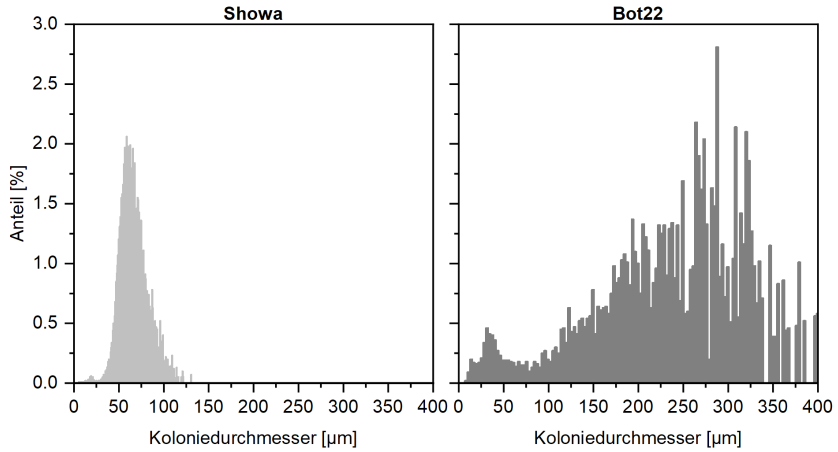


Abbildung 4-9: Größenverteilung des Koloniedurchmessers der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 während der Wachstumsphase.

4.3.2 Mikroskopische Untersuchung zur Koloniebildung und der Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe von *Botryococcus braunii* Bot22

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Koloniebildung des Stammes Bot22 wurden in Abbildung 4-10 zusammengefasst. Bei der Zellteilung des Stammes Bot22 konnte beobachtet werden, dass sich eine Zelle in zwei Tochterzellen aufteilt (Abbildung 4-10 B und C) Wie in Abbildung 4-10 A ersichtlich, sind die beiden Tochterzellen nach der Zellteilung am basalen Bereich von einer äußeren Schicht umgeben, welche bei weiteren Zellteilungen am basalen Bereich erhalten bleiben und zu einem Wachstum der Kolonie führen (Abbildung 4-10 B, C, D). Mit zunehmender Koloniegröße arrangieren sich die einzelnen Zellen und Tochterzellkomplexe in der Kolonie durch Ausrichtung des apikalen Zellbereiches zum Kolonieäußeren (Abbildung 4-10 C). Im weiteren Verlauf des Koloniewachstums (Abbildung 4-10 D) ordnen sich die Zellen als sphärische Schicht an, wobei die einzelnen Zellen und Tochterzellkomplexe am basalen Bereich über die nach der Zellteilung verbleibenden dünnen Schichten verbunden bleiben. Wie in Abbildung 4-10 E zu erkennen ist, unterteilt sich die Kolonie im weiteren Verlauf des Koloniewachstums in mehrere Subkolonien, welche sich nach dem Erreichen einer bestimmten Größe in Tochterkolonien aufteilt.

Die lichtmikroskopischen- (A) und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (B) zur Zellteilung und zur Sekretion der langkettigen Kohlenwasserstoffe bei dem *Botryococcus braunii* Stamm Bot22 sind zusammenfassend in Abbildung 4-11 dargestellt. Wie in Abbildung 4-11 1A und 1B ersichtlich wird, sind die Lipidkörper im Cytoplasma zwischen dem wandständigen Chloroplast lokalisiert. Mit zunehmendem Wachstum der Zelle (Abbildung 4-11 2A und 2B) ist ebenfalls eine Zunahme der Zellgröße zu verzeichnen. Die Lipidkörper sind im zentralen Bereich der Zelle um den Zellkern herum lokalisiert und nehmen leicht an Größe zu (Abbildung 4-11 2B). Mit dem Ausprägen des Septums zwischen den beiden Tochterzellen lässt sich zum einen eine Aufteilung der Lipidkörper zwischen den beiden Tochterzellen feststellen und zum anderen eine erhöhte Konzentration an Lipidkörper im Bereich des Septums beobachten (Abbildung 4-11 3B). Im Zuge der vollständigen Ausbildung der Zellmembran der beiden Tochterzellen kann lateral zwischen den beiden Tochterzellen sowie am basalen Bereich der Zellen eine Akkumulation an Lipiden beobachtet werden (Abbildung 4-11 4). Bis zur vollständigen Ausprägung der Chloroplasten lassen sich lateral im Inneren der Zelle nahe der Zellmembran Lipidkörper beobachten, welche sich mit zunehmender Alterung der Zellen im Zentrum der Zellen lokalisieren lassen (Abbildung 4-11 5A und 5B).

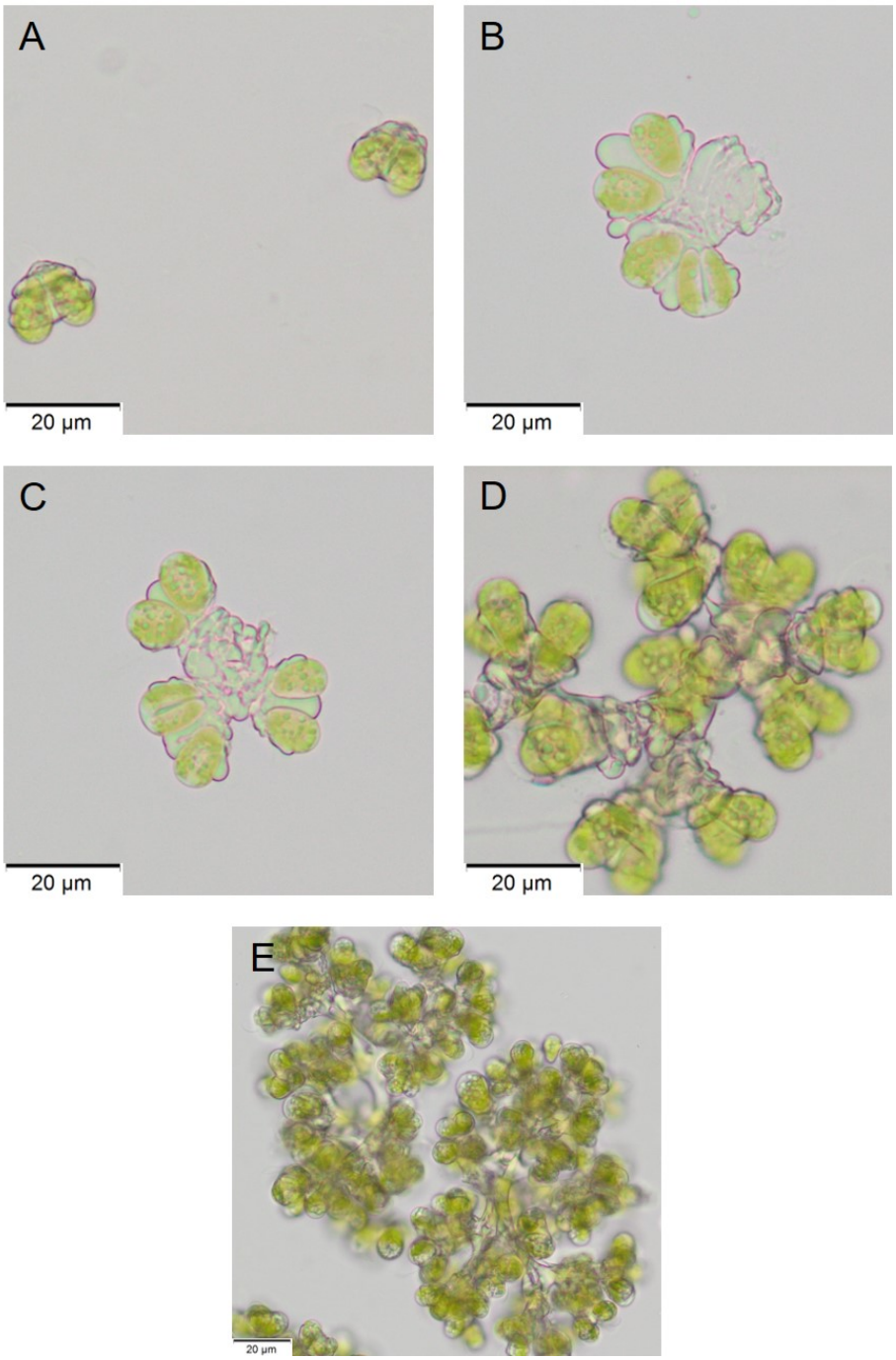


Abbildung 4-10: Mikroskopische Aufnahmen zur Betrachtung der Koloniebildung bei *Botryococcus braunii* Bot22.

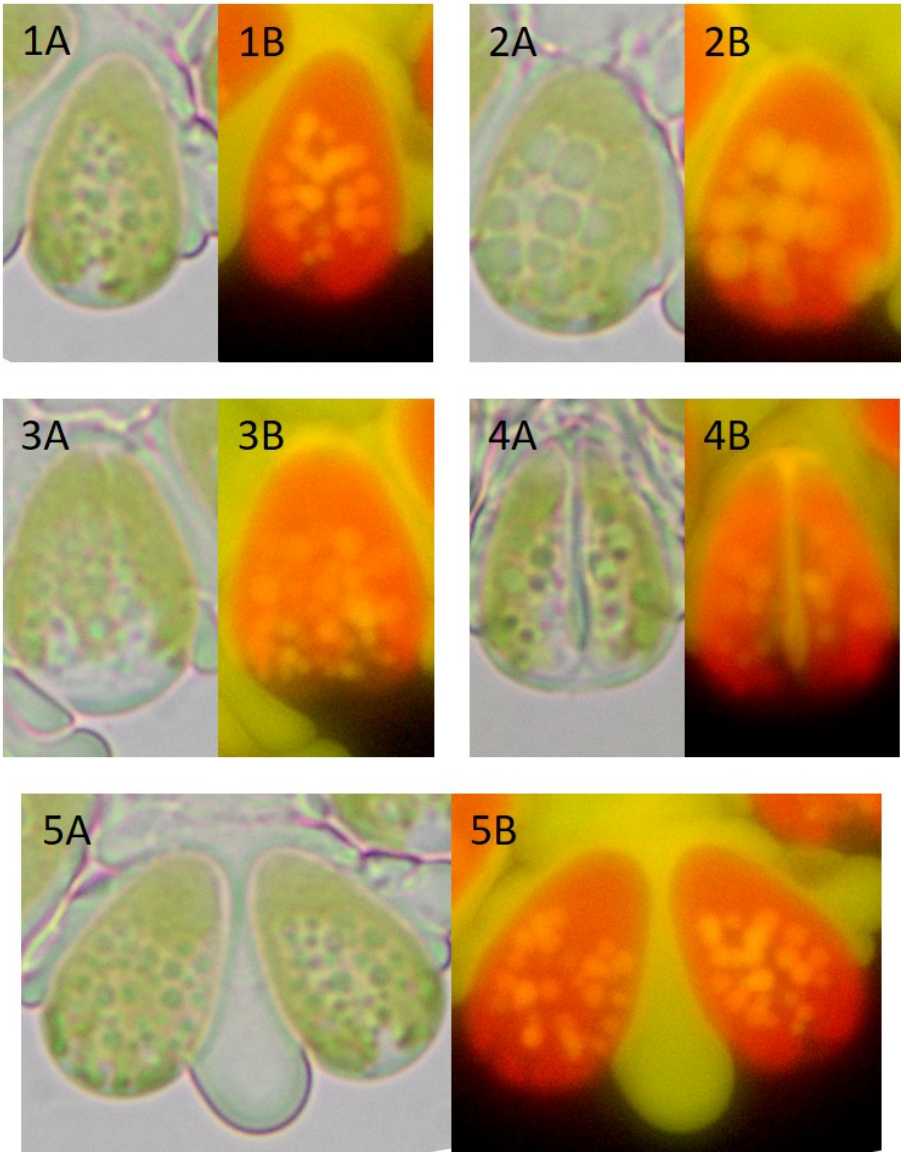


Abbildung 4-11: **Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellteilung und der Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* Bot22.**

4.4 *In situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter optimierter Extraktionszeit im Labormaßstab

Für die Durchführung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion wurden die beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22, welche in Abschnitt 4.2 als aussichtsreiche Kandidaten für dieses Verfahren identifiziert wurden, untersucht. Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft (Abschnitt 2.4) konnten keine Daten bezüglich der optimalen Extraktionszeit für den Stamm Showa ermittelt werden. Der Stamm Bot22 wurde bereits für das Verfahren der *in situ*-Extraktion untersucht, allerdings wurden die Experimente nach dem Prinzip Mischabsetzer, in von dieser Arbeit abweichenden Kultivierungssystemen oder unter Nutzung anderer Lösungsmittel durchgeführt. Aus diesem Grund war eine Ableitung von Kenngrößen, wie der optimalen Extraktionszeit oder der benötigten Phasengrenzfläche für das in dieser Arbeit genutzte Verfahren der *in situ*-Extraktion nicht realisierbar. Daher wurden beide Stämme (Showa und Bot22) zunächst hinsichtlich der optimalen Extraktionszeit charakterisiert und nachfolgend unter der jeweils optimalen Extraktionszeit über eine Dauer von 30 Tagen der *in situ*-Extraktion unterzogen. Mit der Durchführung der in diesem Abschnitt dargestellten Versuche sollte die prinzipielle Eignung der beiden Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion aufgezeigt und erste Kennzahlen bezüglich der Ausbeute an extrazellulären Kohlenwasserstoffen ermittelt werden. Die Ergebnisse zu diesem Kapitel wurden im Journal of Applied Phycology unter dem Titel „*In situ* extraction (milking) of the two promising *Botryococcus braunii* strains Showa and Bot22 under optimized extraction time“ veröffentlicht.

Abbildung 4-12: ***In situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* in 3 L Blasensäulenreaktoren mit angeschlossener Extraktionseinheit.**

4.4.1 Optimierung der Extraktionszeit

Zur Ermittlung geeigneter Extraktionsbedingungen wurden die vorselektierten *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der täglichen Extraktionszeit von 50 bis 350 min über einen Zeitraum von 7 Tagen der *in situ*-Extraktion unterzogen, wobei von zwei unterschiedlichen Startbiomassekonzentrationen ausgegangen wurde (Abbildung 4-13). Eine Zunahme der Biomassekonzentration konnte für den Stamm Showa bis zu einer täglichen Extraktionszeit von 250 min festgestellt werden. Für den Stamm Bot22 war eine Biomassezunahme bis zu einer Extraktionszeit von 150 min zu verzeichnen. Bei einer täglichen Extraktionszeit von 300 min (Showa) und 200 min (Bot22) stagnierte die Biomassekonzentration im Bereich der Startbiomassekonzentration, wohingegen bei Extraktionszeiten von 350 min (Showa) bzw. 250 min (Bot22) eine deutliche Abnahme der Biomassekonzentration gemessen werden konnte. Diese Entwicklung der Biomassekonzentration bei den jeweiligen täglichen Extraktionszeiten konnte für beide Startbiomassekonzentrationen (1,5 und 2,5 $g_X\ L^{-1}$) detektiert werden.

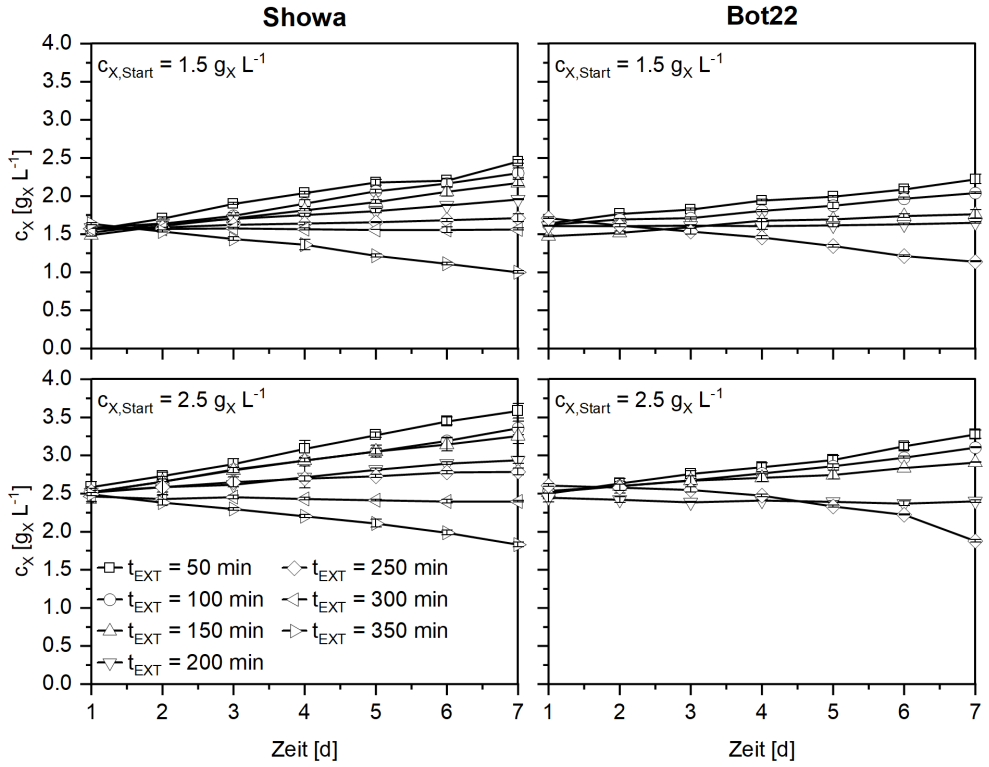


Abbildung 4-13: **Entwicklung der Biomassekonzentration der *Botryococcus braunii* Stämme Showa (links) und Bot22 (rechts) bei Startbiomassekonzentrationen von 1,5 (oben) und 2,5 $g_X\ L^{-1}$ (unten) während der *in situ*-Extraktion über 7 Tage mit täglichen Extraktionszeiten von 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 min. Darstellung der Werte als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Betrachtet man die mittlere Biomasseproduktivität bei den jeweiligen täglichen Extraktionszeiten (Abbildung 4-14 und Tabelle 4-7) lässt sich feststellen, dass bei beiden Startbiomassekonzentrationen und beiden Stämmen die Produktivität an Biomasse mit steigender täglicher Extraktionszeit abnahm. Für den Stamm Showa konnte für beide Startbiomassekonzentrationen bis zu einer täglichen Extraktionszeit von 200 min eine positive mittlere Biomasseproduktivität ermittelt werden, welche sich im Bereich von 50 bis 150 min nicht signifikant unterschied (ANOVA, $F_{35,41} = 155,01$, $p < 0,05$/Holm-Sidak, $t \leq -1,89$, $p > 0,05$). Bei den Extraktionszeiten 250 und 300 min wurde eine Stagnation der mittleren Biomasseproduktivität zwischen -0,002 ± 0,006 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und 0,023 ± 0,008 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 1,5\ g_X\ L^{-1}$) bzw. -0,011 ± 0,021 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und 0,042 ± 0,021 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 2,5\ g_X\ L^{-1}$) detektiert. Zwischen beiden Extraktionszeiten (250 und 300 min) konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (ANOVA, $F_{35,41} = 155,01$, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, $t = -2,45$, $p > 0,05$). Bei einer täglichen Extraktionszeit von 350 min konnte mit -0,106 ± 0,022 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 1,5\ g_X\ L^{-1}$) und -0,110 ± 0,026 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 2,5\ g_X\ L^{-1}$) eine deutliche Abnahme der Produktivität an Biomasse verzeichnet werden.

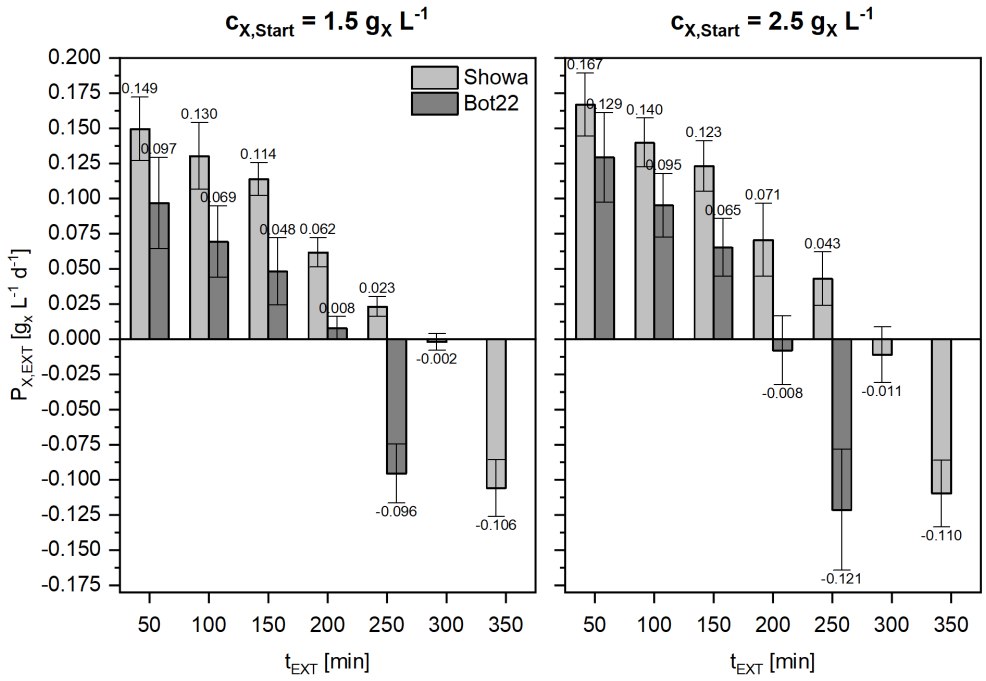


Abbildung 4-14: **Biomasseproduktivität der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei Startbiomassekonzentrationen von 1,5 und 2,5 $g_X\ L^{-1}$ unter täglichen Extraktionszeiten von 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 min über 7 Tage *in situ*-Extraktion. Darstellung der Produktivität als Mittelwert ± SD aus 6 Probenahmetagen (n = biologische Replikate).**

Für den Stamm Bot22 war unabhängig von der Startbiomassekonzentration für Extraktionszeiten bis 150 min eine positive Biomasseproduktivität zu verzeichnen und wie bei

dem Stamm Showa, kein signifikanter Unterschied zwischen der ermittelten Biomasseproduktivität und der jeweiligen Extraktionszeit festzustellen (ANOVA, $F_{25,29} = 56,43$, $p < 0,05$/Holm-Sidak, $t \geq -1,82$, $p > 0,05$). Eine Stagnation der Biomasseproduktivität mit $0,007 \pm 0,009\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 1,5\ g_X\ L^{-1}$) und $-0,008 \pm 0,027\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ($c_{X,Start} = 2,5\ g_X\ L^{-1}$) konnte bei einer täglichen Extraktionszeit von 200 min ermittelt werden. Dahingegen wurde bei einer Extraktionszeit von 250 min eine signifikante Abnahme Biomasseproduktivität bei beiden Biomassekonzentrationen ermittelt (ANOVA, $F_{25,29} = 56,43$, $p < 0,05$/Holm-Sidak, $t \geq -6,05$, $p < 0,05$). Während die optimale Extraktionszeit für Bot22 bei 200 min liegt, zeigt das für Showa ermittelte Optimum von 300 min, dass dieser Stamm länger extrahiert werden kann, ehe sich der Kontakt mit dem Lösungsmittel negativ auf Wachstum und Vitalität der Kultur auswirkt.

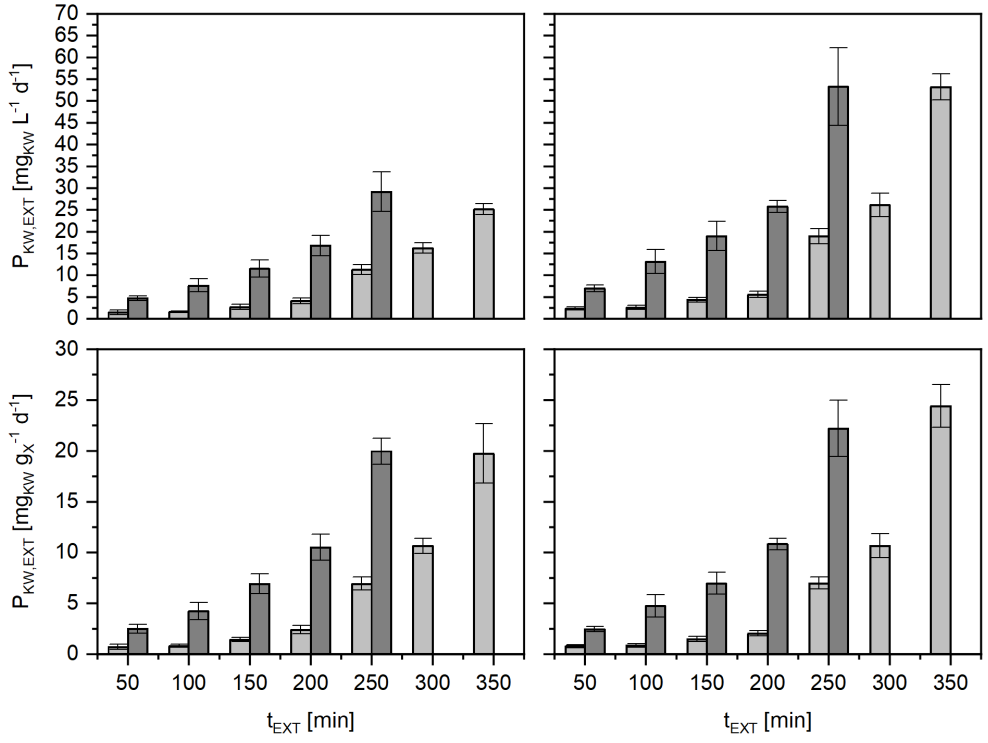


Abbildung 4-15: **Vergleich volumetrischen- (oben) und der biomassebezogenen Kohlenwasserstoffproduktivität (unten) der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei Startbiomassekonzentrationen von 1,5 $g_X\ L^{-1}$ (links) und 2,5 $g_X\ L^{-1}$ (rechts) und täglicher Extraktionszeit von 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 min. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD aus 7 Probenahmetagen (n = 3 biologische Replikate).**

Unter Betrachtung der Kohlenwasserstoffproduktivität in Abhängigkeit der Extraktionszeit (Abbildung 4-15 und Tabelle 4-7), konnte eine Zunahme der Kohlenwasserstoffproduktivität mit steigender Extraktionszeit bei beiden Stämmen und Startbiomassekonzentrationen festgestellt werden. Für die optimale Extraktionszeit (Stagnation der Biomasseproduktivität) und einer Startbiomasse von $1,5\ g_X\ L^{-1}$ wurde eine Kohlenwasserstoffproduktivität von

16,185 ± 1,202 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (Showa) und von 16,750 ± 2,318 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (Bot22) ermittelt. Bei einer Startbiomassekonzentration von 2,5 g_X L^{-1} konnte eine signifikant höhere Kohlenwasserstoffproduktivität mit 26,102 ± 2,675 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} für Showa (ANOVA, $F_{12,13}$ = 68,59, $p < 0,05$) und mit 25,701 ± 1,378 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} für Bot22 (ANOVA, $F_{12,13}$ = 162,44, $p < 0,05$) gemessen werden.

Bezogen auf die Biomasse im Kultivierungssystem ergab sich unter optimaler Extraktionszeit von 300 min für den Stamm Showa eine Kohlenwasserstoffproduktivität von 10,632 ± 0,759 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1} bei $c_{X,Start}$ = 1,5 g_X L^{-1} und 10,655 ± 1,171 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1} bei $c_{X,Start}$ = 2,5 g_X L^{-1}. Für den Stamm Bot22 wurde unter optimaler Extraktionszeit von 200 min eine auf die Biomasse bezogene Kohlenwasserstoffproduktivität von 10,479 ± 1,294 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1} ($c_{X,Start}$ = 1,5 g_X L^{-1}) und 10,813 ± 0,579 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1} ($c_{X,Start}$ = 2,5 g_X L^{-1}) ermittelt. Damit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen und zwischen den beiden Startbiomassekonzentrationen bei der auf die Biomasse bezogene Kohlenwasserstoffproduktivität unter der jeweils optimalen Extraktionszeit festgestellt werden (ANOVA, $F_{24,27}$ = 0,0055, p = 0,941).

Tabelle 4-7: **Vergleich der Biomasse- und Kohlenwasserstoffproduktivität während der *in situ*-Extraktion über 7 Tage bei Extraktionszeiten von 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 min der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22.**

Stamm	t_{EXT} [min]	$c_{X,Start} = 1,5\ g_X\ L^{-1}$			$c_{X,Start} = 2,5\ g_X\ L^{-1}$		
	$At_{EXT,eff}$ [$m^2\ s\ L^{-1}$]	P_X [$g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$]	P_X [$g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$]
Showa	**50**	0,149	1,422	0,690	0,167	2,275	0,752
	14	± 0,009	± 0,531	± 0,252	± 0,010	± 0,344	± 0,151
	100	0,130	1,537	0,797	0,154	2,485	0,842
	55	±0,019	± 0,156	± 0,171	± 0,012	± 0,462	± 0,172
	150	0,113	2,614	1,408	0,123	4,305	1,473
	123	±0,012	± 0,566	± 0,220	± 0,007	± 0,576	± 0,257
	200	0,025	4,020	2,389	0,071	5,536	2,021
	218	±0,012	± 0,654	± 0,403	± 0,004	± 0,750	± 0,267
	250	0,023	11,232	6,922	0,043	18,881	6,969
	341	±0,009	± 1,105	± 0,627	± 0,012	± 1,765	± 0,565
	300	-0,005	16,185	10,632	-0,011	26,102	10,655
	491	±0,004	± 1,202	± 0,759	± 0,007	± 2,675	± 1,171
	350	-0,106	25,090	19,723	-0,109	53,171	24,397
	669	±0,013	± 1,200	± 2,909	± 0,017	± 2,955	± 2,131
Bot22	**50**	0,097	4,702	2,438	0,129	6,917	2,448
	14	±0,016	± 0,534	± 0,444	± 0,011	± 0,756	± 0,268
	100	0,064	7,582	4,221	0,095	13,055	4,723
	55	±0,016	± 1,478	± 0,843	± 0,006	± 2,745	± 1,125
	150	0,054	11,426	6,918	0,065	18,912	6,943
	123	±0,014	± 1,969	± 0,972	± 0,009	± 3,310	± 1,073
	200	0,008	16,750	10,479	-0,008	25,701	10,813
	218	±0,005	± 2,318	± 1,294	± 0,005	± 1,378	± 0,579
	250	-0,096	29,114	19,952	-0,070	53,246	22,176
	341	±0,014	± 4,500	± 1,277	± 0,014	± 8,930	± 2,777

P_X: Mittelwert ± SD aus 6 Probenahmetagen (n = 3 biologische Replikate)
$P_{KW,EXT}$: Mittelwert ± SD aus 7 Probenahmetagen (n = 3 biologische Replikate)

4.4.2 *In situ*-Extraktion unter optimaler Extraktionszeit

Die Ergebnisse zur *in situ*-Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 über 30 Tage wurden in Abbildung 4-16 und Tabelle 4-8 dargestellt. In Abbildung 4-16A wird ersichtlich, dass die Biomassekonzentration über den Verlauf der Extraktion bei beiden Stämmen um die Startbiomassekonzentration schwankte. Bei einer durchschnittlichen Biomassekonzentration des Stammes Showa von 1,619 ± 0,238 $g_X\ L^{-1}$ wurde während der Extraktion eine maximale und minimale Biomassekonzentration von 1,968 ± 0,019 $g_X\ L^{-1}$ bzw. 1,164 ± 0,027 $g_X\ L^{-1}$ detektiert. Bei dem Stamm Bot22 betrug die durchschnittliche Biomassekonzentration im System 1,538 ± 0,135 $g_X\ L^{-1}$ und unterschied sich aufgrund der Schwankungen während der Extraktion mit einer maximalen und minimalen Biomassekonzentration von 1,793 ± 0,005 $g_X\ L^{-1}$ bzw. 1,355 ± 0,025 $g_X\ L^{-1}$ nicht signifikant von der mittleren Biomassekonzentration des Stammes Showa (ANOVA, $F_{58,59}$ = 2,516, p = 0,118). Die durchschnittliche Biomasseproduktivität, während der *in situ*-Extraktion beider Stämme unterschied sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (ANOVA, $F_{58,59}$ = 0,054, p = 0,817). Für den Stamm Showa wurde diese mit 0,005 ± 0,103 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und für den Stamm Bot22 mit 0,001 ± 0,094 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ (Bot22) detektiert. Die maximale und minimale Biomasseproduktivität wurde bei dem Stamm Showa mit 0,187 ± 0,006 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ bzw. -0,185 ± 0,009 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und bei dem Stamm Bot22 mit 0,182 ± 0,004 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ bzw. -0,182 ± 0,009 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ermittelt.

Betrachtet man den Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse lassen sich starke Schwankungen über den Verlauf der *in situ*-Extraktion bei beiden Stämmen feststellen. Der Kohlenwasserstoffgehalt während der *in situ*-Extraktion betrug für den Stamm Showa durchschnittlich 0,538 ± 0,098 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ und unterschied sich signifikant von der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe des Stammes Bot22 mit 0,417 ± 0,141 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ (ANOVA, $F_{58,59}$ = 14,626, p < 0,05). Während die maximale Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen bei beiden Stämmen mit 0,708 ± 0,041 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ (Showa) und 0,667 ± 0,024 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ (Bot22) mit einem Unterschied von ca. 6 % relativ nah beieinander lagen, unterschied sich die minimal detektierte Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe mit 0,322 ± 0,040 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ (Showa) und 0,183 ± 0,060 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ (Bot22) um ca. 43 %.

Für die volumetrische- (ANOVA, $F_{58,59}$ = 7,148, p =0,010) und biomassespezifische Produktivität (ANOVA, $F_{58,59}$ = 7,131, p = 0,010) an extrahierten Kohlenwasserstoffen (Tabelle 4-8), kann ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Stämmen festgestellt werden. Mit 16,989 ± 3,241 $g_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$ liegt die volumetrische Kohlenwasserstoffproduktivität des Stammes Showa ca. 17 % über der des Stammes Bot22 mit 14,526 ± 3,866 $g_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$.

Die biomassespezifische Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe des Stammes Showa liegt ca. 13 % über der des Stammes Bot22.

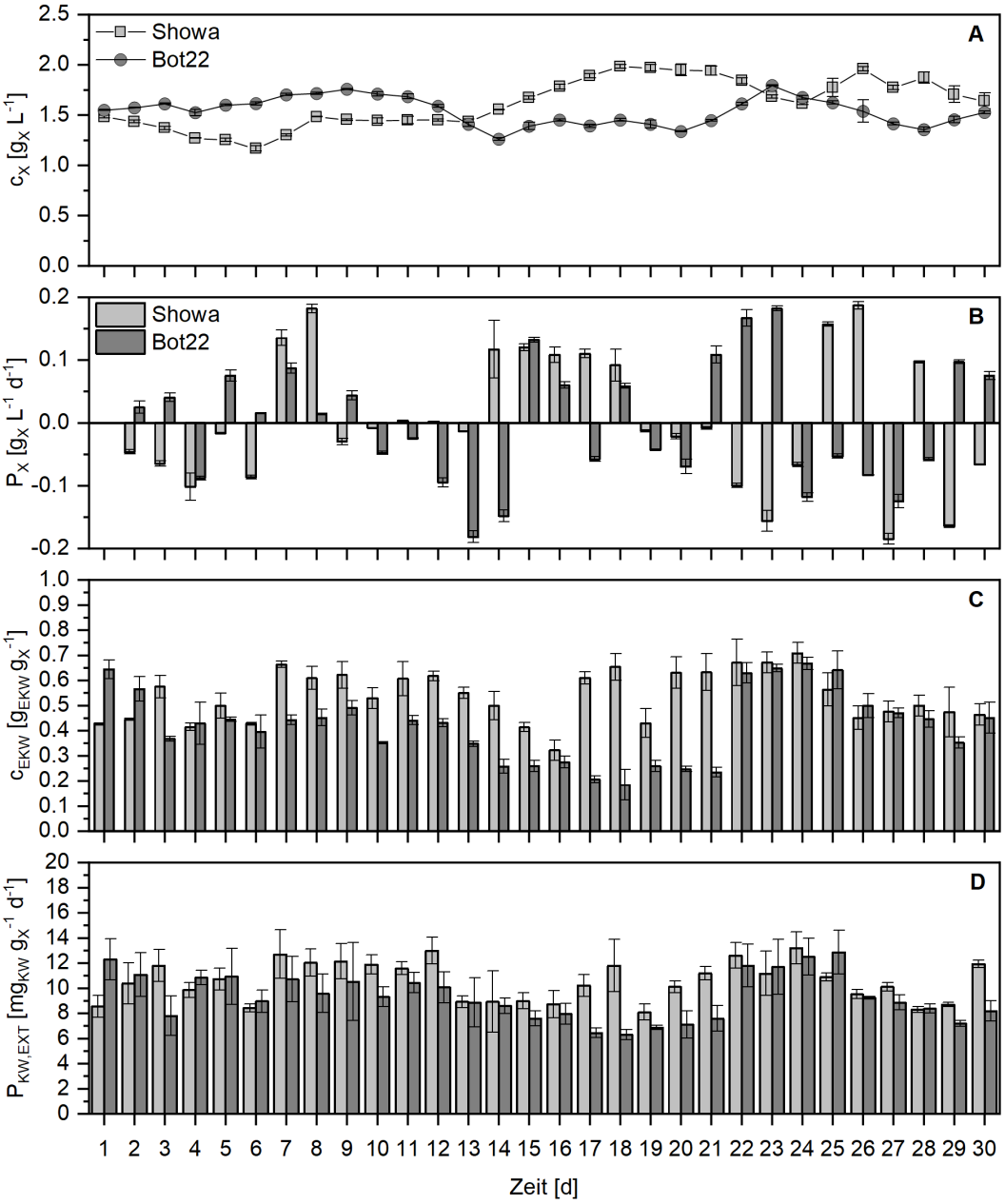


Abbildung 4-16: **Darstellung der täglichen Biomassekonzentration (A), der volumetrischen Biomasseproduktivität (B), des Kohlenwasserstoffgehaltes (C) und der biomassespezifischen Kohlenwasserstoffproduktivität (D) über 30 Tage *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Die erhöhte volumetrische und biomassespezifische Produktivität an extrahierten extrazellulären Kohlenwasserstoffen spiegelt sich auch in der Gesamtausbeute über 30 Tage *in situ*-Extraktion wider. Mit 509,66 ± 95,61 mg_{KW} L^{-1} liegt diese für den Stamm Showa um ca. 17 % höher als die des Stammes Bot22. Im Durchschnitt konnten pro Tag für beide Stämme ca. 1 % der im System befindlichen Biomasse an Kohlenwasserstoffen extrahiert werden. Verglichen mit dem Stamm Bot22 (28,33 ± 7,41 $\%_X$) konnte für den Stamm Showa (31,48 ± 5,90 $\%_X$) eine um ca. 10 % höhere biomassebezogene Gesamtausbeute an Kohlenwasserstoffen detektiert werden. Setzt man die tägliche volumetrische und biomassespezifische Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe mit der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen der Biomasse während der durchgeführten *in situ*-Extraktion über 30 Tage ins Verhältnis (Abbildung 4-17) lässt sich ein direkter Zusammenhang ableiten. Mit einer steigenden Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse erhöht sich die Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen während der *in situ*-Extraktion.

Tabelle 4-8: **Vergleich der ermittelten Kennzahlen von Kultivierung und Extraktion während 30-tägiger *in situ*-Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter optimierter Extraktionszeit in 3 L Blasensäulenreaktoren.**

		Showa	Bot22
$c_{X,Start}$	$[g_X\ L^{-1}]$	1,482 ± 0,012	1,547 ± 0,005
$\emptyset_X$	$[g_X\ L^{-1}]$	1,619 ± 0,238	1,538 ± 0,135
P_X	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	0,005 ± 0,103	0,001 ± 0,094
$\emptyset_{EKW}$	$[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	0,538 ± 0,098	0,417 ± 0,139
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}]$	16,989 ± 3,241	14,526 ± 3,866
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}]$	10,534 ± 1,544	9,338 ± 1,852
$Y_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ L^{-1}]$	509,66 ± 95,61	435,31 ± 114,03
$Y_{KW,EXT}$	$[\%_{\emptyset_X}]$	31,48 ± 5,90	28,33 ± 7,41

Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate)

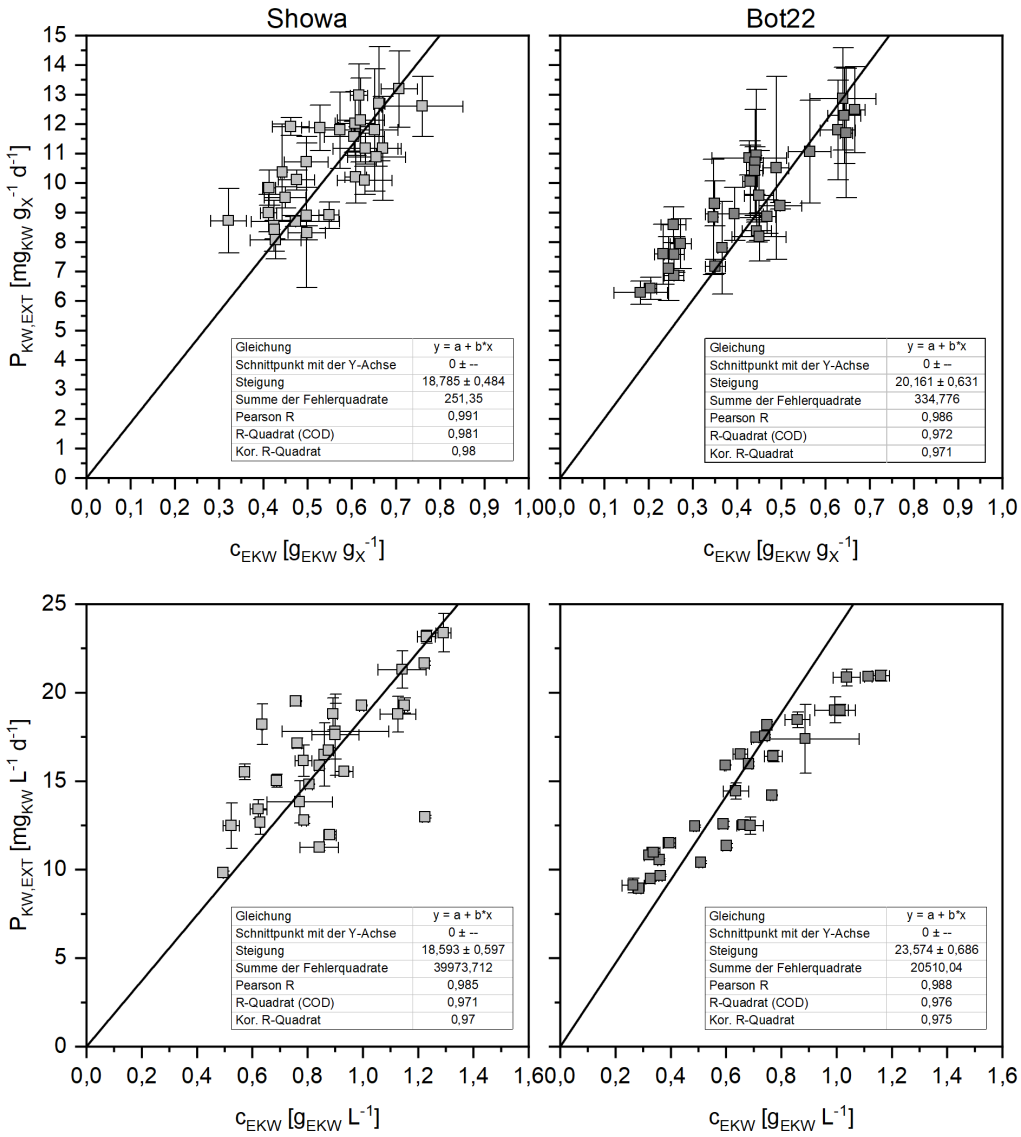


Abbildung 4-17: **Korrelation der biomassespezifischen- (oben) und volumetrischen (unten) Kohlenwasserstoffproduktivität mit der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse der *Botryococcus braunii* Stämme Showa (links) und Bot22 (rechts) während der *in situ*-Extraktion unter optimaler Extraktionszeit in 3 L Blasensäulenreaktoren. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

4.5 Scale-up der Kultivierung und *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 auf 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktoren

Für das Scale-up des Verfahrens der *in situ*-Extraktion auf einen größeren Maßstab wurde zunächst die Kultivierung der beiden für das *in situ*-Extraktionsverfahren geeigneten *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22, von 1,5 bzw. 3,0 L-Blasensäulen- auf 6,0 L-Flat-Panel Airlift-Reaktoren (FPA-Reaktoren) übertragen. Weiterführend wurden die 6,0 L FPA-Reaktoren mit Extraktionssäulen ausgestattet (Abbildung 4-18) und *in situ*-Extraktionen über 10 Tage durchgeführt. In diesem Zusammenhang sollte der für das Verfahren der *in situ*-Extraktion optimale Durchmesser des Partikelerzeugers (Düse) ermittelt werden. Hierfür wurde die in Abschnitt 4.4 für den jeweiligen Stamm als optimale charakterisierte, volumen-, reaktor-, und partikelerzeuger-abhängige Extraktionszeit, in eine vom volumen-, reaktor- und partikelerzeuger-unabhängige Extraktionszahl ($At_{EXT,eff}$) mit Hilfe der Gleichungen aus Abschnitt 3.5.2 überführt. Auf Basis der für den jeweiligen Stamm optimalen Extraktionszahl wurde dann die Extraktionszeit (t_{EXT}) für den jeweils untersuchten Düsendurchmesser bestimmt. Abschließend erfolgte die Durchführung einer Langzeit-*in situ*-Extraktion über 45 Tage unter der jeweils optimalen Extraktionszeit und dem jeweils optimalen Düsendurchmesser.

Abbildung 4-18: *In situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* in 6,0 L FPA-Reaktoren mit angeschlossener Extraktionseinheit.

4.5.1 Wachstum der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 in 6,0 L FPA-Reaktoren

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 in den untersuchten 6,0 L FPA-Reaktoren mit dem Wachstum in 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren (Abbildung 4-19 und Tabelle 4-9) konnte ein deutlich besseres Wachstum in den 6,0 L-FPA-Reaktoren verzeichnet werden. Nach 28 Tagen Kultivierung lag die Biomassekonzentration für den Stamm Showa mit 5,46 ± 0,029 $g_X\,L^{-1}$ um 71 % über der Biomassekonzentration in den 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren mit 3,26 ± 0,055 $g_X\,L^{-1}$. Bei dem Stamm Bot22 lag die Biomassekonzentration mit 4,14 ± 0,01 $g_X\,L^{-1}$ nach 28 Tagen ca. 33 % über der in den Blasensäulenreaktoren. Vergleicht man die beiden Stämme untereinander, lag die Biomassekonzentration nach 28 Tagen in den Blasensäulen-Reaktoren mit einem Unterschied von ungefähr 4 % nahezu gleich auf, wohingegen der Stamm Showa in den FPA-Reaktoren nach der gleichen Kultivierungszeit 32 % mehr Biomasse bildete. Dieser Sachverhalt spiegelt sich ebenfalls in der maximalen volumetrischen Biomasseproduktivität wider. Diese lag für den Stamm Showa in den FPA-Reaktoren 64 % über der in den 1,5 L Blasensäulen. Die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Bot22 lag in den FPA-Reaktoren ca. 24 % über der der 1,5 L Blasensäulen. Untereinander lag die maximale Biomasseproduktivität des Stammes Showa ebenfalls 32 % über der des Stammes Bot22 in den FPA-Reaktoren (Tabelle 4-9). Die maximale Biomasseproduktivität wurde in den FPA-Reaktoren nach 15 Kultivierungstagen für den Stamm Showa und nach 18 Kultivierungstagen für den Stamm Bot22 bei einer Biomassekonzentration von 2,928 ± 0,151 $g_X\,L^{-1}$ (Showa) bzw. 2,603 ± 0,197 $g_X\,L^{-1}$ (Bot22) erreicht. In den 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren wurde die maximale Biomasseproduktivität bereits bei 1,624 ± 0,082 $g_X\,L^{-1}$ und nach 12 Kultivierungstagen für den Stamm Showa und bei 1,720 ± 0,116 $g_X\,L^{-1}$ und nach 13 Kultivierungstagen bei dem Stamm Bot22 erreicht.

Betrachtet man die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse (Abbildung 4-20), konnte über den Verlauf der Kultivierung für beide Kultivierungssysteme und Stämme eine konstante Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse beobachtet werden. Die höchste Abweichung mit 6 % (Blasensäule) und 10 % (FPA-Reaktor) zur durchschnittlichen Konzentration an Kohlenwasserstoffen, wurde für Bot22 ermittelt. Für Showa lag die Abweichung zur mittleren Kohlenwasserstoffkonzentration bei ca. 5 % für beide Kultivierungssysteme. Bezüglich der durchschnittlichen Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen, konnte kein signifkanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen in den FPA-Reaktoren und den Blasensäulen festgestellt werden (ANOVA, $F_{72,75} = 1,359$, $p = 0,247$). Bei dem Vergleich der Kultivierungssysteme konnte für die FPA-Reaktoren eine signifkant höhere Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen

feststgestellt werden (ANOVA, $F_{72,75} = 36{,}614$, $p < 0{,}05$). Die durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen lag in den FPA-Reaktoren verglichen zu den Blasensäulen-Reaktoren für den Stamm Showa um ca. 15 % und für den Stamm Bot22 um ca. 9 % höher. Die maximale Produktivität an extrazellulären Kohlenwasserstoffen lag, im Vergleich zu den Blasensäulen-Reaktoren, in den FPA-Reaktoren um ca. 28 % höher für den Stamm Showa und um ca. 35 % höher für den Stamm Bot22.

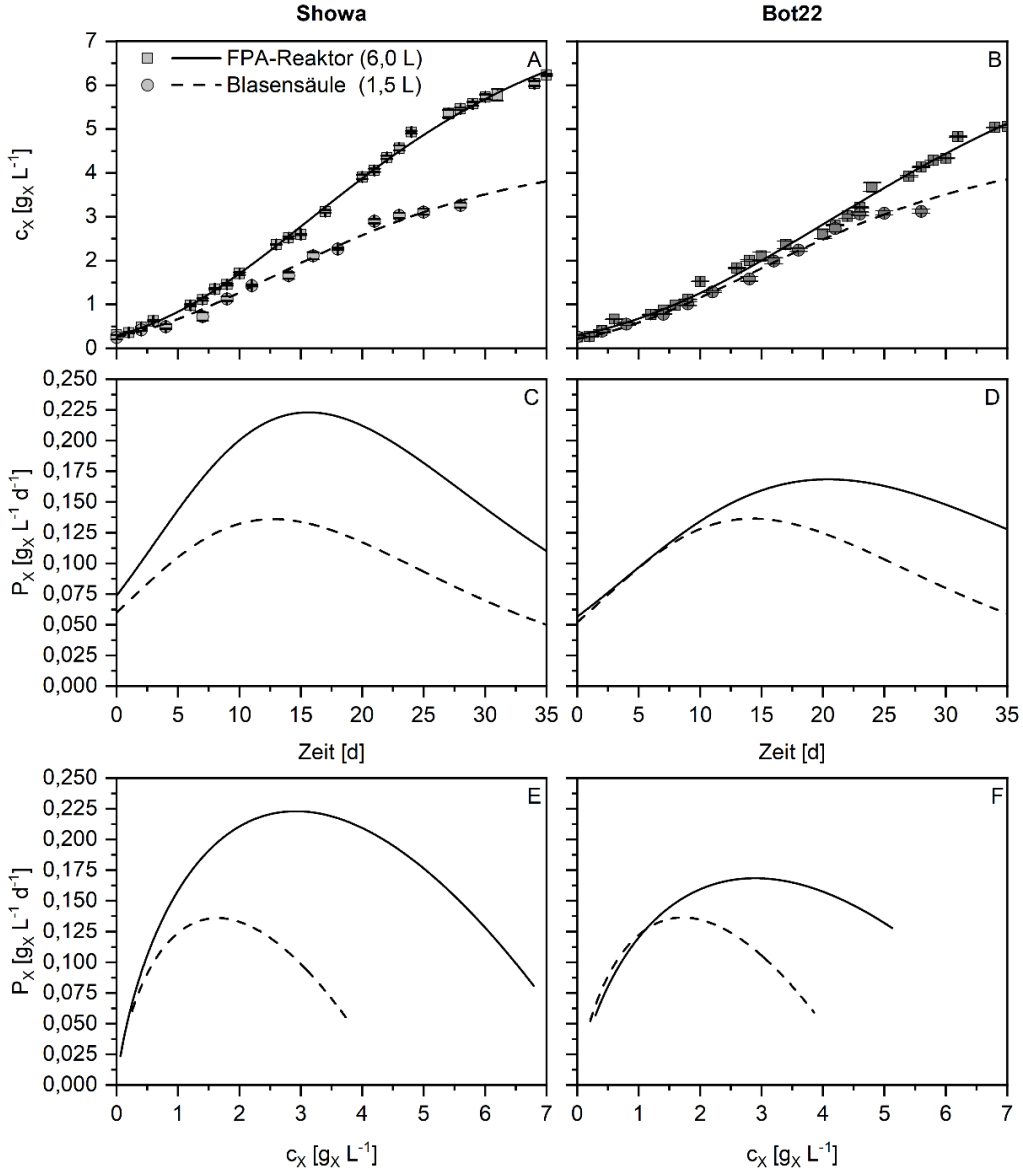


Abbildung 4-19: **Vergleich der volumetrischen Biomassekonzentration (A und B) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (C und D) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit sowie der Biomassekonzentration in Abhängigkeit der Biomasseproduktivität der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 während der Kultivierung in 1,5 L Blasensäulen- und 6,0 L FPA-Reaktoren. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

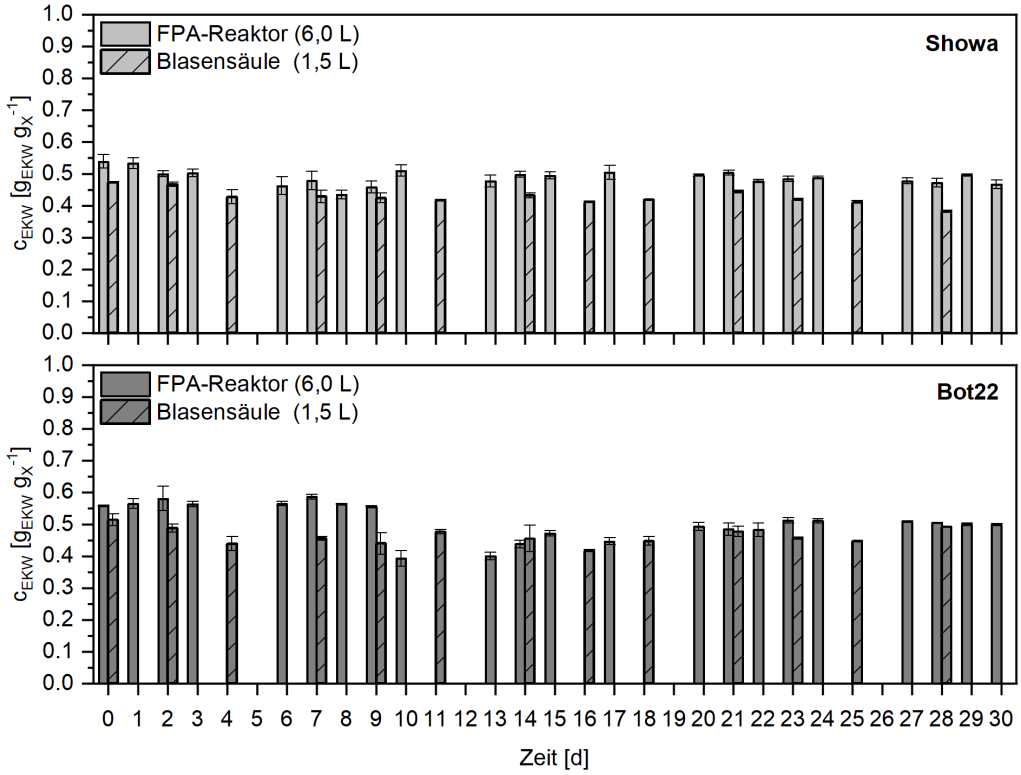


Abbildung 4-20: **Darstellung des Massenanteils extrazellulärer Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 für die Kultivierung in 6,0 L FPA- und 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Tabelle 4-9: **Vergleich der Kultivierung der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 in 6,0 L FPA- und 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren.**

Kultivierungssystem		**FPA-Reaktor (6,0 L)**		**Blasensäule (1,5 L)**	
Stamm		**Showa**	**Bot22**	**Showa**	**Bot22**
$P_{X,max}$	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	0,223 ± 0,014	0,168 ± 0,013	0,136 ± 0,010	0,136 ± 0,008
$c_{X,P_{X,max}}$	$[g_X\ L^{-1}]$	2,928 ± 0,151	2,603 ± 0,197	1,624 ± 0,082	1,720 ± 0,116
$P_{X,\emptyset}$	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	0,169 ± 0,004	0,137 ± 0,001	0,107 ± 0,002	0,102 ± 0,002
$c_{X,max}$	$[g_X\ L^{-1}]$	6,235 ± 0,149	5,059 ± 0,053	3,259 ± 0,055	3,122 ± 0,047
P_{EKW}	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	0,109 ± 0,010	0,085 ± 0,006	0,085 ± 0,006	0,063 ± 0,004
$\emptyset_{EKW}$	$[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	0,490 ± 0,023	0,505 ± 0,052	0,427 ± 0,023	0,462 ± 0,026
$c_{EKW,max}$	$[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	0,518 ± 0,003	0,586 ± 0,008	0,431 ± 0,007	0,477 ± 0,008

Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate)

4.5.2 Übertragung der *in situ*-Extraktion auf 6,0 L FPA-Reaktoren

Für die Übertragung der *in situ*-Extraktion auf die 6,0 L FPA-Reaktoren wurden die in Abschnitt 4.4 für das 3,0 L Blasensäulensystem ermittelte optimale Extraktionszeit von 300 min für den Stamm Showa und 200 min für den Stamm Bot22 anhand der in Abschnitt 3.5.2 aufgeführten Gleichungen in die vom Reaktorsystem unabhängige Extraktionszahl ($\boldsymbol{At_{EXT,eff}}$) überführt. Wie aus Tabelle 4-10 zu entnehmen, beträgt diese für den Stamm Showa 464,230 und für den Stamm Bot22 206,324 m^2 s L_{Susp}^{-1}.

Tabelle 4-10: **Parameter zur Ermittlung der optimalen Extraktionszahl ($\boldsymbol{At_{EXT,eff}}$) für die optimale Extraktionszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22.**

Stamm		**Showa**	**Bot22**
$\boldsymbol{t_{EXT,opt}}$	[min]	300	200
$\boldsymbol{D_{Disp}}$	[mm]	5	
$\boldsymbol{\dot{V}_{Susp}}$	[L min^{-1}]	0,118	
$\boldsymbol{d_P}$	[mm]	7,88	
$\boldsymbol{V_{Susp}}$	[L]	3	
$\boldsymbol{t_{EXT,eff}}$	[s]	12,91	8,61
$\boldsymbol{A_{EXT,eff}}$	[m^2 L_{Susp}^{-1}]	35,977	23,985
$\boldsymbol{At_{EXT,eff}}$	[m^2 s L_{Susp}^{-1}]	**464,230**	**206,324**

Anhand der Extraktionszahl unter optimaler Extraktionszeit wurde dann die für den jeweiligen Düsendurchmesser von 5, 4, 2 und 1 mm benötigte Extraktionszeit ($\boldsymbol{t_{EXT}}$) für die 6,0 L FPA-Reaktoren ermittelt. Wie aus Tabelle 4-11 entnommen werden kann, beträgt die Extraktionszeit für den Stamm Showa und den dazugehörigen Düsendurchmesser von 5, 4, 2 und 1 mm 911, 885, 672 bzw. 562 min. Für den Stamm Bot22 belaufen sich die anzuwendenden Extraktionszeiten auf 607, 590, 448 bzw. 375 min für die Düsendurchmesser von 5, 4, 2 und 1 mm.

Tabelle 4-11: **Parameter zur Berechnung der Extraktionszeit (t_{EXT}) unter optimaler Extraktionszahl der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei verschiedenen Düsendurchmessern.**

Stamm		**Showa**				**Bot22**			
$\boldsymbol{At_{EXT,eff}}$	[m^2 s L_{Susp}^{-1}]	464,230				206,324			
$\boldsymbol{\dot{V}_{Susp}}$	[L min^{-1}]	0,0778							
$\boldsymbol{D_{Disp}}$	[mm]	5	4	2	1	5	4	2	1
$\boldsymbol{d_P}$	[mm]	7,78	7,37	3,89	2,92	7,78	7,37	3,89	2,92
$\boldsymbol{V_{Susp}}$	[L]	6							
$\boldsymbol{t_{EXT,eff}}$	[s]	12,91	12,42	8,65	7,75	8,61	8,28	5,76	5,17
$\boldsymbol{A_{EXT,eff}}$	[m^2 L_{Susp}^{-1}]	35,96	37,37	53,70	59,91	23,98	24,91	35,80	39,94
$\boldsymbol{t_{EXT}}$	**[min]**	**911**	**885**	**672**	**562**	**607**	**590**	**448**	**375**

4.5.3 Untersuchung zum Einfluss des Düsendurchmessers auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion

Anhand des Verlaufs der in Abbildung 4-21 dargestellten Biomassekonzentration über 10 Tage *in situ*-Extraktion bei unterschiedlichen Durchmessern der Düse wird deutlich, dass bei den beiden *Botryococcus braunii* Stämmen Showa und Bot22 ein Durchmesser der Düse von 5 mm, 4 mm und 2 mm keinen wesentlichen Einfluss auf die Biomassekonzentration ausübt. Bei einem Düsendurchmesser von 1 mm war hingegen eine kontinuierliche Abnahme der Biomassekonzentration über den Verlauf der *in situ*-Extraktion bei beiden Stämmen festzustellen.

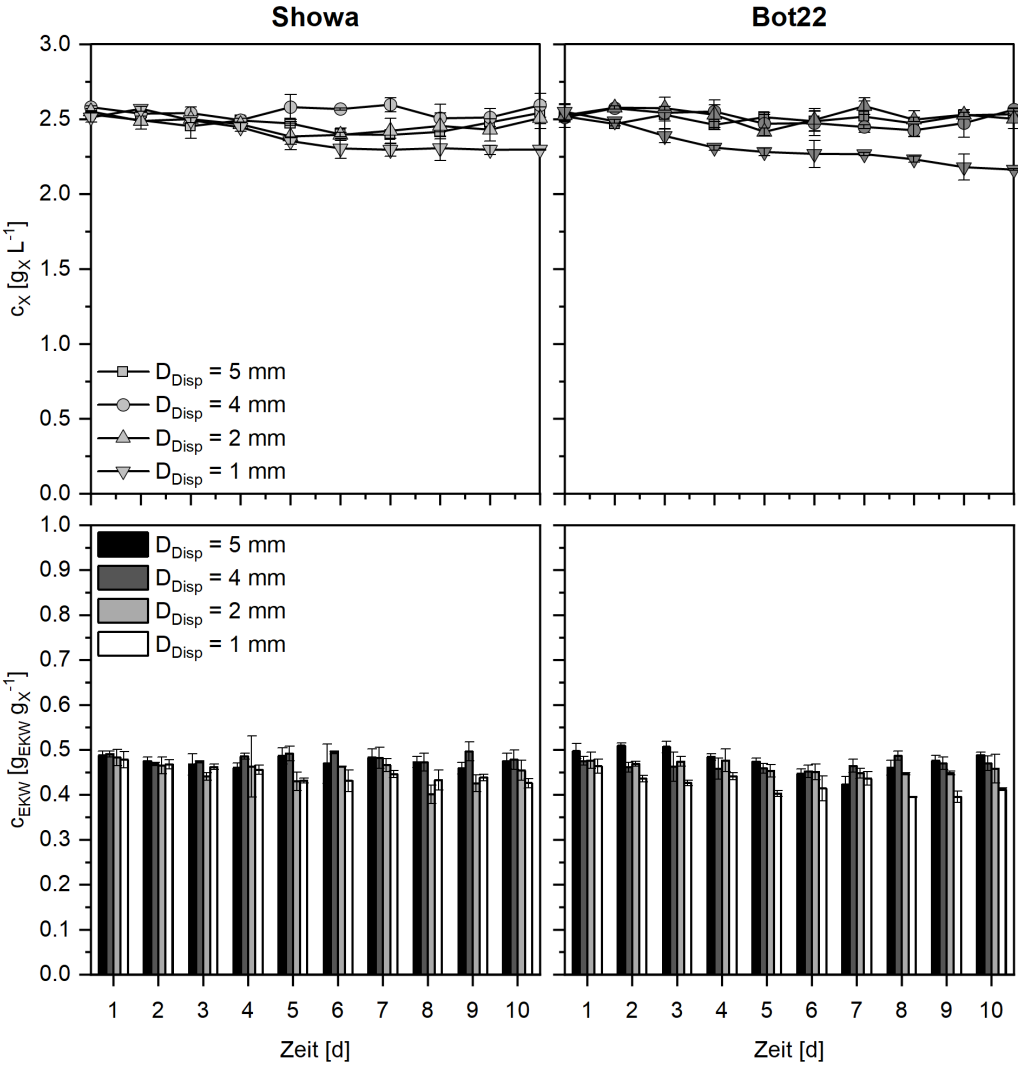


Abbildung 4-21: **Darstellung der Biomassekonzentration (oben) und der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse (unten) der Stämme Showa (links) und Bot22 (rechts) bei unterschiedlichen Düsendurchmessern (5, 4, 2 und 1 mm) während der *in situ*-Extraktion über 10 Tage in 6,0 L FPA-Reaktoren. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Für den Stamm Showa sinkt die Biomassekonzentration von 2,513 ± 0,033 $g_X\ L^{-1}$ zum Start der *in situ*-Extraktion auf 2,297 ± 0,003 $g_X\ L^{-1}$ nach 10 Extraktionstagen. Bei dem Stamm Bot22 ist ein ähnlicher Verlauf festzustellen. Die Biomassekonzentration sinkt von 2,550 ± 0,055 $g_X\ L^{-1}$ auf 2,165 ± 0,007 $g_X\ L^{-1}$ über einen Zeitraum von 10 Extraktionstagen. Ein ähnlicher Trend kann auch über die durchschnittliche tägliche Biomasseproduktivität (Abbildung 4-22 A) hergeleitet werden. Während bei Düsendurchmessern von 5, 4 und 2 mm die Biomasseproduktivität über den Extraktionszeitraum stagniert, ist bei einem Durchmesser von 1 mm eine durchschnittliche Biomasseproduktivität von -0,024 ± 0,044 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für den Stamm Showa und von -0,043 ± 0,031 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für den Stamm Bot22 festzustellen (Tabelle 4-12). Aufgrund der hohen Schwankungen der Biomasseproduktivität über die 10 Extraktionstage, kann allerdings bei beiden Stämmen kein signifikanter Einfluss des Düsendurchmessers auf die Biomasseproduktivität festgestellt werden (ANOVA, $F_{64,71} = 0,1877$, $p = 0,904$).

Betrachtet man die Entwicklung der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse über den Verlauf der 10-tägigen *in situ*-Extraktionen bei den unterschiedlichen Düsendurchmessern (Abbildung 4-21), dann lässt sich erkennen, dass die Differenz zwischen der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen am Beginn der Extraktion und am Ende der Extraktion bei beiden Stämmen mit 0,013 bis 0,021 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für den Stamm Showa und mit 0,009 bis 0,012 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für den Stamm Bot22 bei den Düsendurchmessern von 5, 4 und 2 mm relativ gering ausfällt. Dahingegen betrug die Differenz zwischen der Startkonzentration und der Endkonzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen bei dem Durchmesser von 1 mm zwischen 0,054 und 0,064 $g_{KW}\ g_X^{-1}$. Berechnet man den Mittelwert des Kohlenwasserstoffgehaltes der beiden Stämme bei den jeweiligen Düsendurchmessern, dann lässt sich für die Durchmesser von 5, 4 und 2 mm sowohl bei dem Stamm Showa (ANOVA, $F_{27,29} = 3,056$, $p = 0,0636$), als auch für Bot22 (ANOVA, $F_{27,29} = 2,159$, $p = 0,135$) kein signifikanter Unterschied feststellen. Dahingegen liegt der Mittelwert der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Biomasse bei 1 mm Durchmesser mit 0,438 ± 0,018 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für den Showa (ANOVA, $F_{36,39} = 14,513$, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, $t > -3,75$, $p < 0,05$) und mit 0,420 ± 0,026 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für den Stamm Bot22 (ANOVA, $F_{36,39} = 14,849$, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, $t > -4,26$, $p < 0,05$) im Vergleich zu den größeren Durchmessern von 5, 4 und 2 mm signifikant niedriger.

Vergleicht man die Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen während der 10-tägigen *in situ*-Extraktion (Abbildung 4-22 B, C, D und Tabelle 4-12), dann lässt sich ein signifikanter Anstieg der biomassespezifischen Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe für den Stamm Showa (ANOVA, $F_{36,39} = 41,65$, $p < 0,05$), als auch für den Stamm Bot22

(ANOVA, $F_{36,39}$ = 42,1, p < 0,05) mit sinkendem Düsendurchmesser feststellen. Vergleicht man die biomassespezifische Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe der Stämme Showa und Bot22 bei dem jeweiligen Durchmesser, dann kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ANOVA, $F_{72,79}$ = 0,178, p = 0,911).

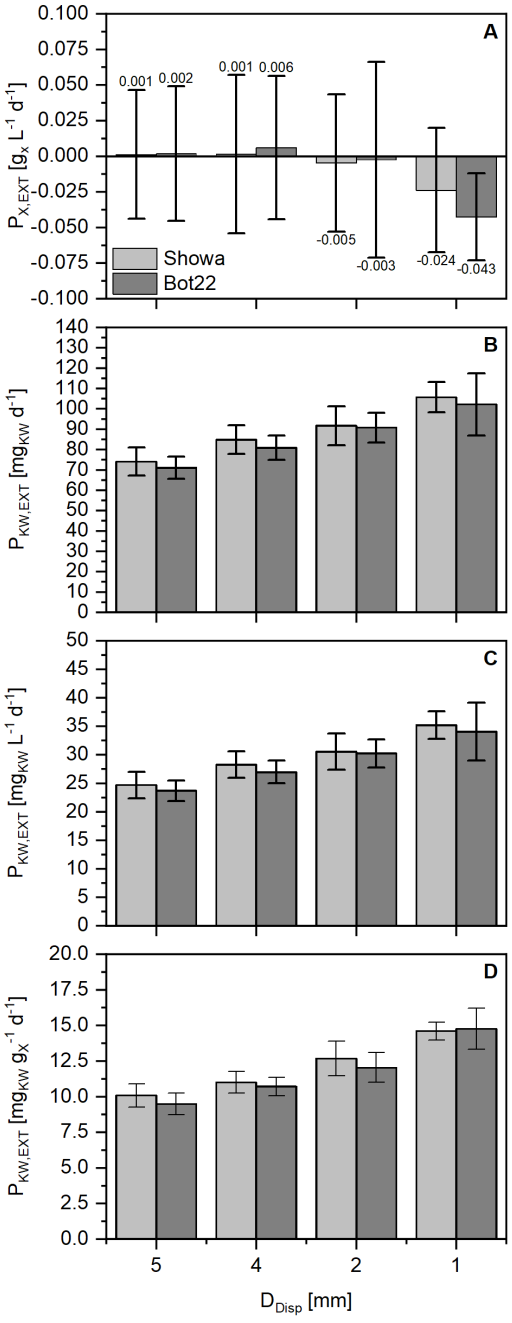


Abbildung 4-22: **Volumetrische Biomasseproduktivität (A), Gesamt- (B), volumetrische (C) und biomassespezifische Produktivität an Kohlenwasserstoffen (D) der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei unterschiedlichen Durchmessern der Düse während der *in situ*-Extraktion. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte ± SD ($P_{X,EXT}$: 9 Probenahmetage, n = 3 biologische Replikate; $P_{KW,EXT}$: 10 Probenahmetage, n = 3 biologische Replikate).**

Da bei dem Düsendurchmesser von 1 mm zwar die höchste Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen ermittelt wurde, der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen, als auch die Biomassekonzentration über den Verlauf der 10-tägigen *in situ*-Extraktion aber signifikant abnahm, lässt sich dieser Durchmesser als weniger geeignet für längere *in situ*-Extraktionen einstufen. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche ein Düsendurchmesser von 2 mm als optimaler Durchmesser festgelegt, da bei diesem Durchmesser sowohl die Biomassekonzentration als auch der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen über die 10 Tage *in situ*-Extraktion nicht signifikant variierte, aber dennoch eine hohe Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen erzielt wurde.

Tabelle 4-12: **Vergleich der volumetrischen Produktivität an Biomasse sowie der volumetrischen- und biomassespezifischen Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei unterschiedlichen Düsendurchmessern während der *in situ*-Extraktion über 10 Tage in 6,0 L FPA-Reaktoren.**

Stamm	D_{Disp} [mm]	P_X [$g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$]
Showa	5	0,001 ± 0,045	24,67 ± 2,45	9,99 ± 0,89
	4	0,001 ± 0,056	28,25 ± 2,48	11,07 ± 0,92
	2	-0,005 ± 0,048	30,53 ± 3,38	12,42 ± 1,51
	1	-0,024 ± 0,044	35,19 ± 2,60	14,72 ± 0,63
Bot22	5	0,002 ± 0,047	23,66 ± 1,91	9,46 ± 0,77
	4	0,006 ± 0,050	26,95 ± 2,09	10,76 ± 0,74
	2	-0,003 ± 0,069	30,23 ± 2,59	11,98 ± 1,05
	1	-0,043 ± 0,031	34,04 ± 5,37	14,65 ± 1,56

P_X: Mittelwert ± SD aus 9 Probenahmetagen (n = 3 biologische Replikate)
$P_{KW,EXT}$: Mittelwert ± SD aus 10 Probenahmetagen (n = 3 biologische Replikate)

4.5.4 *In situ*-Extraktion unter optimalem Düsendurchmesser bei glatter und rauer Extraktionssäule

Die Ergebnisse zur *in situ*-Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 über 45 Tage bei optimaler Extraktionskennzahl, einem Düsendurchmesser von 2 mm sowie glatter und rauer Extraktionssäule sind in Abbildung 4-23, Abbildung 4-24 und vergleichend in Tabelle 4-13 dargestellt. Aus Abbildung 4-23A und Abbildung 4-24A ist keine wesentliche Zu- oder Abnahme der Biomassekonzentration über den Verlauf der Extraktion für beide Stämme und Ausführungen der Extraktionssäule ersichtlich. Bei einer durchschnittlichen Biomassekonzentration des Stammes Showa von 2,478 ± 0,194 $g_X\ L^{-1}$ bei glatter bzw. von 2,568 ± 0,165 $g_X\ L^{-1}$ bei rauer Extraktionssäule, wurde während der Extraktion eine maximale und minimale Biomassekonzentration von 2,778 ± 0,003 $g_X\ L^{-1}$ und 2,225 ± 0,009 $g_X\ L^{-1}$ bei glatter bzw. 2,861 ± 0,010 $g_X\ L^{-1}$ und 2,097 ± 0,026 $g_X\ L^{-1}$ bei rauer

Extraktionssäule detektiert. Bei Bot22 betrug die durchschnittliche Biomassekonzentration im System 2,537 ± 0,121 $g_X\ L^{-1}$ bei glatter und 2,500 ± 0,172 $g_X\ L^{-1}$ bei rauer Extraktionssäule. Aufgrund der Schwankungen während der Extraktion mit einer maximalen und minimalen Biomassekonzentration von 2,896 ± 0,008 $g_X\ L^{-1}$ und 2,052 ± 0,017 $g_X\ L^{-1}$ bei glatter bzw. 2,872 ± 0,023 $g_X\ L^{-1}$ und 2,200 ± 0,003 $g_X\ L^{-1}$ bei rauer Extraktionssäule kann zwischen allen Kombinationen kein signifikanter Unterschied der mittleren Biomassekonzentration festgestellt werden (ANOVA, $F_{176,179} = 2,574$, $p = 0,0556$). Die durchschnittliche Biomasseproduktivität, während der *in situ*-Extraktion beider Stämme bei beiden Beschaffenheiten der Extraktionssäule unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (ANOVA, $F_{176,179} = 0,001$, $p = 0,974$). Für den Stamm Showa wurde diese bei glatter mit 0,001 ± 0,151 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und bei rauer Extraktionssäule mit -0,003 ± 0,110 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ermittelt. Bei dem Stamm Bot22 lag die durchschnittliche volumetrische Biomasseproduktivität bei 0,001 ± 0,142 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für die glatte und bei 0,003 ± 0,124 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für die raue Extraktionssäule. Die Minima und Maxima der Werte zur Biomasseproduktivität bei allen Kombinationen verteilen sich dabei, wie aus Abbildung 4-23B und Abbildung 4-24B hervorgeht, homogen über den Verlauf der *in situ*-Extraktionen. Es lässt sich dabei kein klarer Abfall bzw. Anstieg der Biomasseproduktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt der 45-tägigen *in situ*-Extraktionen erkennen.

Betrachtet man den Mittelwert der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen feststellen (ANOVA, $F_{176,179} = 0,693$, $p = 0,558$). Anhand der Standardabweichung bei dem jeweiligen Versuch, welche bei dem Stamm Showa für die glatte und raue Extraktionssäule jeweils 8,5 bzw. 8,7 % und bei dem Stamm Bot22 jeweils 6,8 und 14 % beträgt, lassen sich starke Schwankungen der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse über den Verlauf der *in situ*-Extraktion bei beiden Stämmen feststellen. Unterteilt man die Versuchsdauer von 45 Tagen zur besseren Betrachtung in drei gleich lange Bereiche: Anfang (Tag 1 bis 15), Mitte (Tag 16 bis 30) und Ende (Tag 31 bis 45), lässt sich durch Bildung der Mittelwerte der Kohlenwasserstoffkonzentration in dem jeweiligen Bereich und dem entsprechenden Versuchssetup eine signifikante Abnahme der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse bei den Stämmen Showa und Bot22, als auch unter Verwendung der glatten bzw. rauen Extraktionssäule feststellen (ANOVA, $F_{168,179} = 20,21$, $p < 0,05$). Für den Stamm Showa reduzierte sich der Kohlenwasserstoffgehalt von Anfang über Mitte zu Ende von 0,486 ±0,026 über 0,435 ± 0,020 zu 0,447 ± 0,020 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für die glatte und von 0,520 ±0,065 über 0,446 ± 0,028 zu 0,404 ± 0,019 $g_{KW}\ g_X^{-1}$ für die raue Extraktionssäule. Bei dem Stamm Bot22 war eine Reduzierung des Kohlenwasserstoffgehaltes von 0,495 ±0,016 über 0,455 ± 0,036 zu

0,423 ± 0,016 g_{KW} g_X^{-1} für die glatte und von 0,494 ±0,018 über 0,486 ± 0,041 zu 0,424 ± 0,012 g_{KW} g_X^{-1} für die raue Extraktionssäule detektierbar. Damit reduzierte sich der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse von Anfang zu Ende der 45-tägigen *in situ*-Extraktionen bei dem Stamm Bot22 bei beiden Extraktionssäulen um ca. 14 %, wohingegen die Reduzierung des Kohlenwasserstoffgehaltes bei dem Stamm Showa und der glatten Extraktionssäule nur ca. 8 %, bei der rauen Extraktionssäule aber 22 % betrug.

Für die biomassespezifische Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen konnte unter Verwendung der rauen Extraktionssäule für den Stamm Showa eine um ca. 12 % und bei dem Stamm Bot22 eine um ca. 5 % höhere Produktivität, im Vergleich zur glatten Extraktionssäule, festgestellt werden. Dabei unterscheidet sich die biomassespezifische Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe zwischen glatter und rauer Extraktionssäule bei dem Stamm Bot22 signifikant (ANOVA, $F_{176,179} = 4,735$, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, $t = 3,036$, $p < 0,05$), für den Stamm Showa jedoch nicht (Holm-Sidak, $t = 1,346$, $p = 0,18$). Die Gesamtausbeute über 45 Tage *in situ*-Extraktion liegt mit 1,514 ± 0,233 g_{KW} L^{-1} für den Stamm Showa bei rauer Extraktionssäule um ca. 14 % höher als die Gesamtausbeute von 1,311 ± 0,2,36 g_{KW} L^{-1} bei glatter Extraktionssäule. Für den Stamm Bot22 liegt die Gesamtausbeute an Kohlenwasserstoffen bei rauer Extraktionssäule ca. 4 % über der bei glatter Extraktionssäule. Im Mittel konnten für beide Stämme bei glatter Extraktionssäule ca. 1,2 % und bei rauer Extraktionssäule ca. 1,4 % der Biomasse pro Tag an Kohlenwasserstoffen extrahiert werden.

Tabelle 4-13: **Vergleich der ermittelten Kennzahlen von Kultivierung und Extraktion während 45-tägiger *in situ*-Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter optimaler Extraktionskennzahl und einem Düsendurchmesser von 2 mm in 6,0 L FPA-Reaktoren mit glatter und rauer Extraktionssäule.**

Extraktionssäule		**glatt**		**rau**	
Stamm		**Showa**	**Bot22**	**Showa**	**Bot22**
$c_{X,Start}$	$[g_X\ L^{-1}]$	2,453 ± 0,017	2,554 ± 0,090	2,437 ± 0,001	2,581 ± 0,009
$\emptyset_X$	$[g_X\ L^{-1}]$	2,478 ± 0,194	2,537 ± 0,121	2,568 ± 0,165	2,500 ± 0,172
P_X	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	0,001 ± 0,151	0,001 ± 0,142	-0,003 ± 0,110	0,003 ± 0,124
$\emptyset_{EKW}$	$[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	0,458 ± 0,038	0,456 ± 0,031	0,468 ± 0,041	0,457 ± 0,064
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}]$	29,550 ± 5,260	32,590 ± 4,850	34,230 ± 5,180	33,680 ± 7,020
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}]$	11,940 ± 1,940	12,830 ± 1,700	13,360 ± 1,980	13,390 ± 2,190
$Y_{KW,EXT}$	$[g_{KW}\ L^{-1}]$	1,331 ± 0,236	1,466 ± 0,218	1,541 ± 0,233	1,515 ± 0,316
$Y_{KW,EXT}$	$[\%_{\emptyset_X}]$	53,710 ± 9,520	57,780 ± 8,590	60,000 ± 9,070	60,600 ± 12,63

Mittelwerte ± SD (n = 3 biologische Replikate)

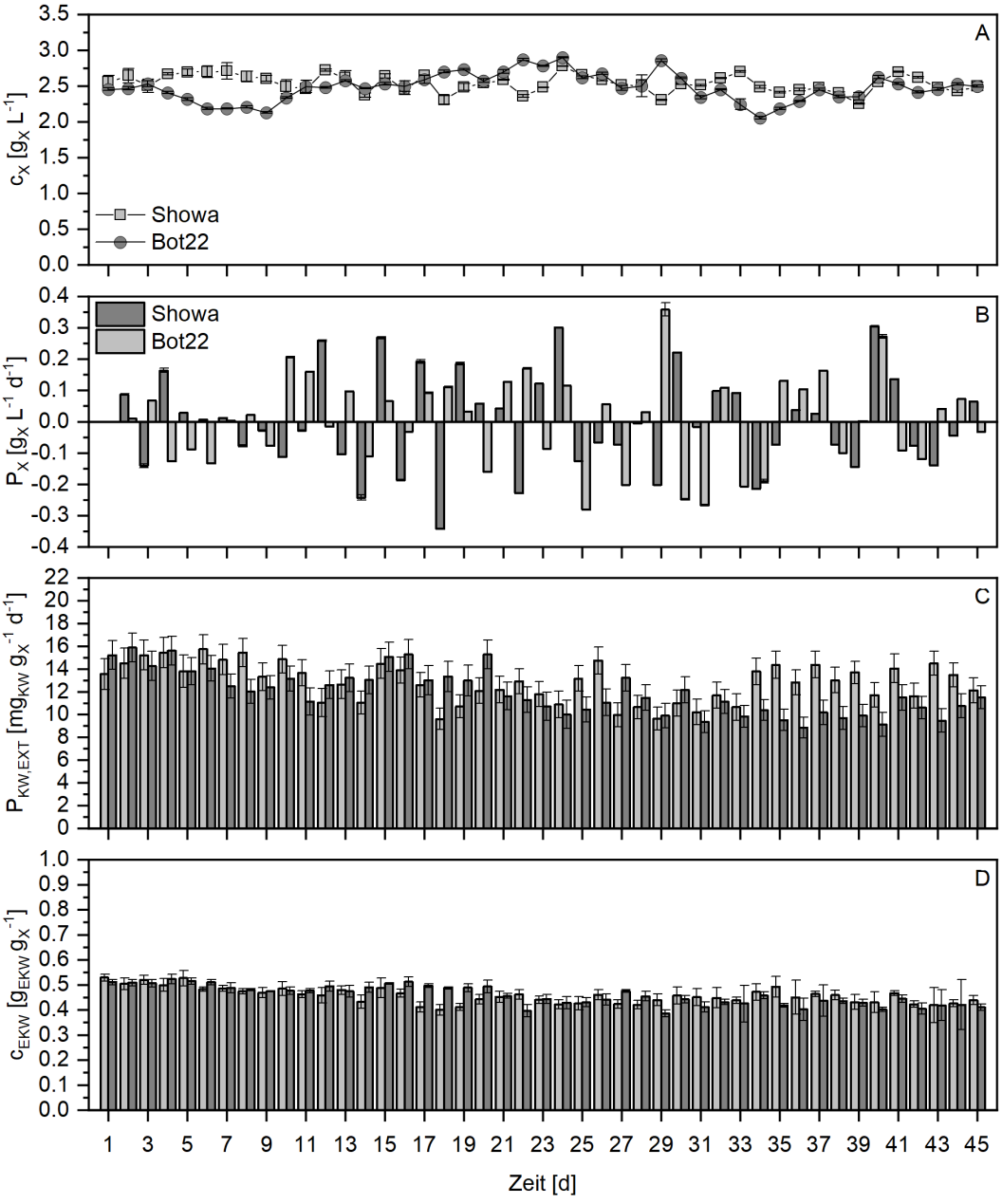


Abbildung 4-23: **Darstellung der Biomassekonzentration (A), der volumetrischen Biomasseproduktivität (B), der Kohlenwasserstoffproduktivität (C) und des Kohlenwasserstoffgehaltes (D) über 45 Tage *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter der optimalen Extraktionskennzahl von $\mathbf{At_{EXT,eff} = 464{,}23\ m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ (Showa) und $\mathbf{At_{EXT,eff} = 206{,}32\ m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ (Bot22) bei einem Düsendurchmesser von 2 mm und glatter Extraktionssäule. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

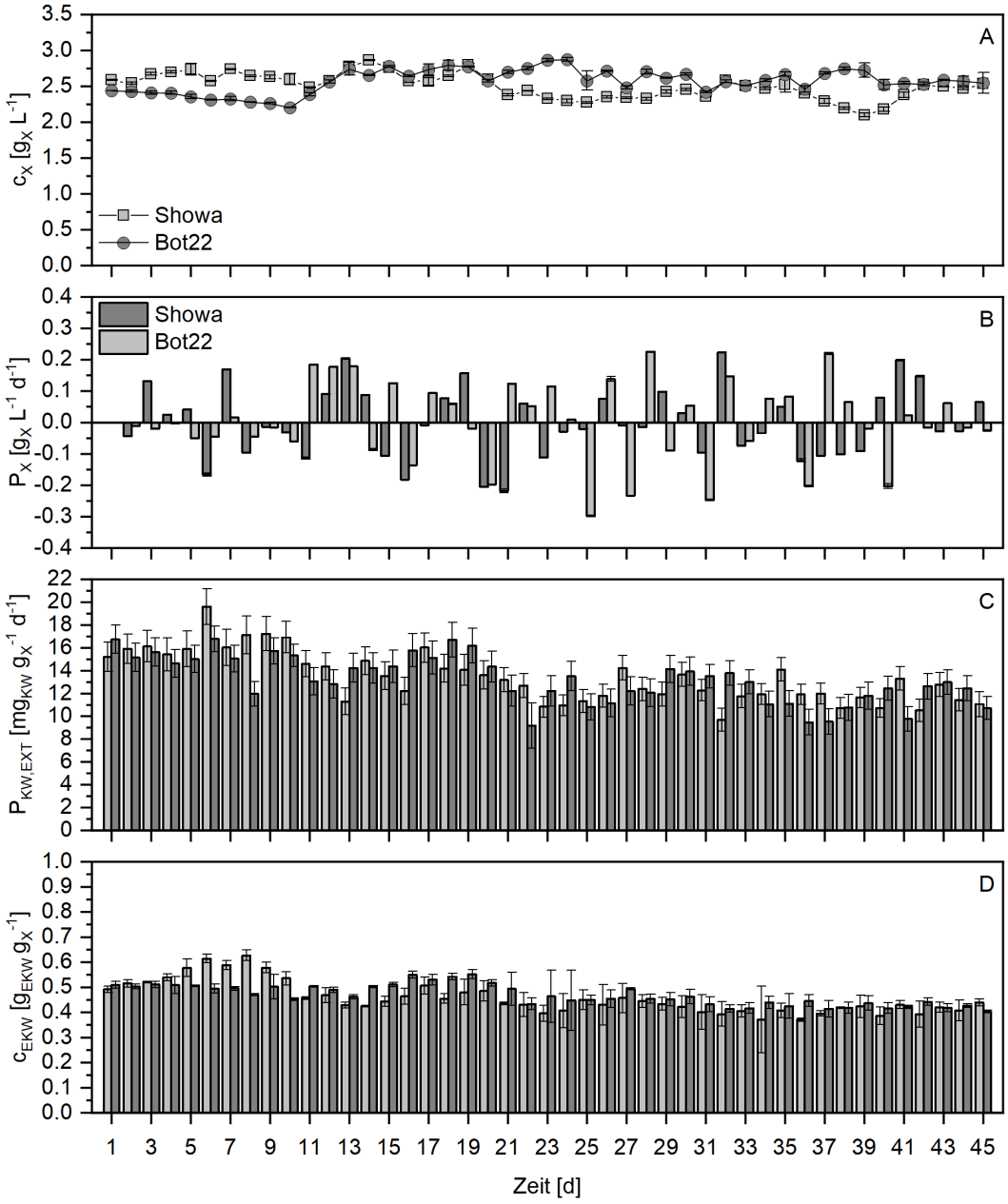


Abbildung 4-24: **Darstellung der Biomassekonzentration (A), der volumetrischen Biomasseproduktivität (B), der Kohlenwasserstoffproduktivität (C) und des Kohlenwasserstoffgehaltes (D) über 45 Tage *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter der optimalen Extraktionskennzahl von $\mathbf{At_{EXT,eff} = 464{,}23\ m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ (Showa) und $\mathbf{At_{EXT,eff} = 206{,}32\ m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ (Bot22) bei einem Düsendurchmesser von 2 mm und rauer Extraktionssäule. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

4.6 Optimierung der Kultivierungsbedingungen der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22

Für die Identifizierung von Kultivierungsparametern, welche zur Steigerung der Ausbeute an extrahierten Kohlenwasserstoffen im Rahmen der *in situ*-Extraktion beitragen, wurden die beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 hinsichtlich des Einflusses der Temperatur, der Beleuchtungszeit und einzelner Nährmedienkomponenten auf die Biomassebildung, als auch auf die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse untersucht.

4.6.1 Temperatur

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei den untersuchten Temperaturen von 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 34 °C (Abbildung 4-25 und Tabelle 4-14) lässt sich im Vergleich zur Kontrollkultur bei 26 °C für den Stamm Showa ein schnelleres Wachstum bei Temperaturen von 28 und 30 °C und bei dem Stamm Bot22 bei Temperaturen von 28, 30 und 32 °C feststellen. Bei dem Stamm Showa führen die niedrigeren Temperaturen von 24 und 22 °C, als auch die hohen Temperaturen von 32 und 34 °C zu einem verringerten Wachstum, wohingegen bei Bot22 nur die niedrigen Temperaturen von 22 und 24 °C zu einer Reduzierung des Wachstums führen. Nach 28 Tagen Kultivierung liegt die Biomassekonzentration für den Stamm Showa bei 28 °C mit 3,686 ± 0,020 $g_X\ L^{-1}$ um 16 % über der Biomassekonzentration der Kontrollkultur bei 26 °C mit 3,180 ± 0,022 $g_X\ L^{-1}$. Bei einer Temperatur von 30 °C liegt die finale Biomassekonzentration bei dem Stamm Showa ca. 5 % über der Kontrollkultur, wohingegen die Temperaturen 24, 22 und 32 °C im Vergleich zur Kontrollkultur zu einer Reduzierung der finalen Biomassekonzentration um 7, 16 und 25 % führen. Bei 34 °C lässt sich für den Stamm Showa kein wesentliches Wachstum mehr feststellen. Bei dem Stamm Bot22 konnte die höchste finale Biomassekonzentration nach 28 Tagen Kultivierung mit 2,885 ± 0,018 $g_X\ L^{-1}$ bei 30 °C detektiert werden und lag damit ca. 25 % über der Kontrollkultur bei 26 °C mit 2,299 ± 0,012 $g_X\ L^{-1}$. Temperaturen von 28 und 32 °C führen bei dem Stamm Bot22 ebenfalls zu einer Steigerung der finalen Biomassekonzentration um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrollkultur bei 26 °C, wohingegen Temperaturen von 24 und 22 °C zu einer Reduzierung der finalen Biomassekonzentration um 6 bzw. 24 % führen. Unter der auf das Wachstum bezogen optimalen Temperatur von 28 °C für den Stamm Showa und 30 °C für den Stamm Bot22, liegt die finale Biomassekonzentration des Stammes Showa ca. 28 % über der des Stammes Bot22.

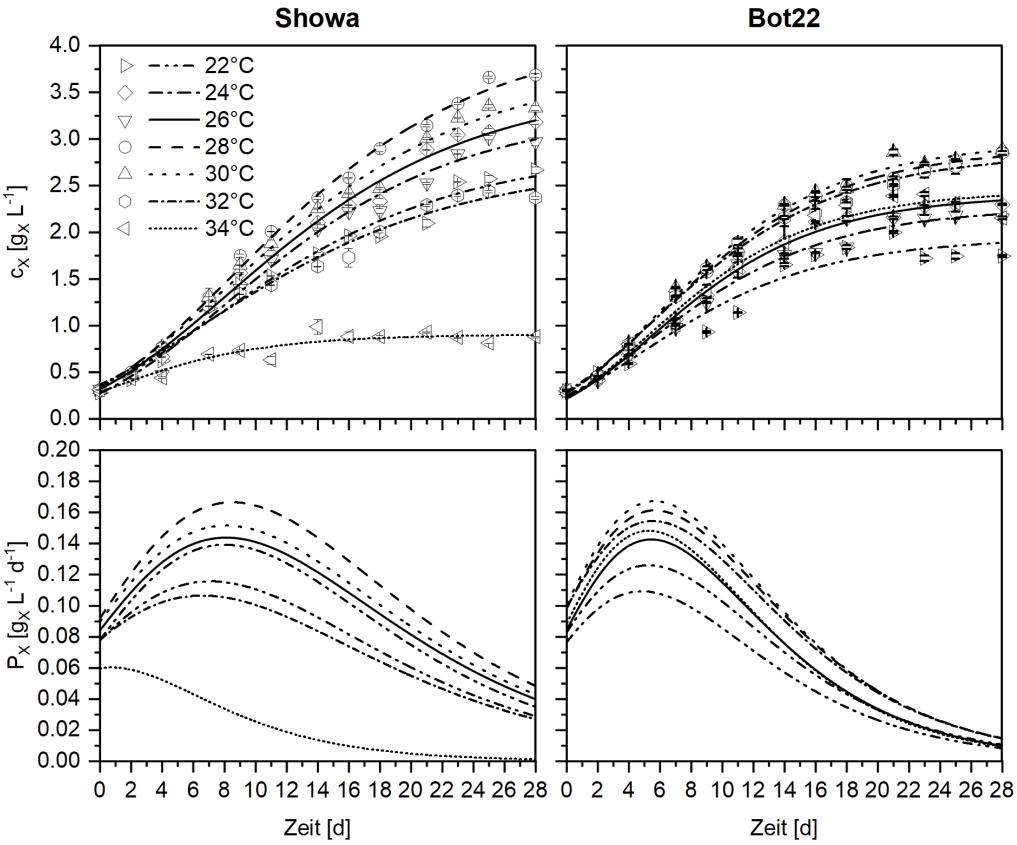


Abbildung 4-25: **Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 während der Kultivierung bei Temperaturen von 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 34 °C. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Jene Beobachtung spiegelt sich ebenfalls in der maximalen Biomasseproduktivität wider. Diese liegt für den Stamm Showa bei 28 °C 15 % über der bei 26 °C. Die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Bot22 bei 30 °C liegt ca. 17 % über der bei 26 °C. Untereinander unterscheidet sich die maximale Biomasseproduktivität des Stammes Showa bei 28 °C mit 0,166 ± 0,012 g_X L^{-1} d^{-1} kaum von der des Stammes Bot22 bei 30 °C mit 0,167 ± 0,010 g_X L^{-1} d^{-1}. Die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Showa wird bei allen Temperaturen zwischen Kultivierungstag 7 und 9 erreicht, wohingegen die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Bot22 bei allen Temperaturen schon zwischen den Kultivierungstagen 5 und 7 ermittelt werden konnte. Bei einer auf die Biomasse bezogenen, optimalen Kultivierungstemperatur, wurde die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Showa in den 1,5 L Blasensäulen-Reaktoren bei einer Biomassekonzentration von 1,547 ± 0,104 g_X L^{-1} und für den Stamm Bot22 bei 1,031 ± 0,283 g_X L^{-1}erreicht.

Betrachtet man die durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse (Abbildung 4-26), lässt sich für den Stamm Showa ein signifikanter Anstieg mit steigender Temperatur bis 32 °C feststellen (ANOVA, $F_{56,62} = 340{,}71$, $p < 0{,}05$). Für diesen Stamm konnte der höchste durchschnittliche Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen mit 0,575 ± 0,027 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ bei 32 °C detektiert werden und lag damit ca. 25 % über dem der Kontrollkultur (Tabelle 4-14). Für den Stamm Bot22 kann bis zu einer Temperatur von 32 °C ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe festgestellt werden (ANOVA, $F_{56,62} = 88{,}81$, $p < 0{,}05$). Mit 0,544 ± 0,027 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ bei 32 °C lag die Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei diesem Stamm ca. 18 % über der der Kontrollkultur. Vergleicht man die Maxima beider Stämme, liegt die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen des Stammes Showa ca. 6 % über der des Stammes Bot22.

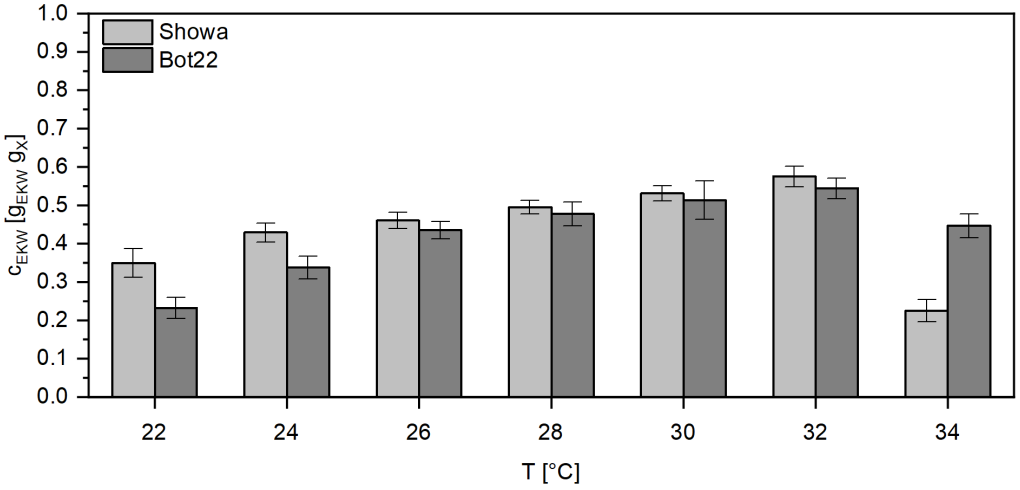


Abbildung 4-26: **Darstellung der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 für die Kultivierung bei Temperaturen von 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 34 °C. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Setzt man die maximale Biomasseproduktivät mit dem Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen als Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ins Verhältnis, liegt das Temperaturoptimum für den Stamm Showa zwischen 28 und 30 °C und für den Stamm Bot22 bei 30 bis 32 °C (Tabelle 4-14). Bezogen auf die Kontrollkultur bei 26 °C kann für den Stamm Showa eine Steigerung der Kohlenwasserstoffproduktivität zwischen 21 und 24 % und für den Stamm Bot22 um 34 bis 37 % festgestellt werden.

Tabelle 4-14: Vergleich der Kultivierung der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei Temperaturen von 22, 24, 26, 28, 30, 32 und 34 °C.

Stamm	T [°C]	$P_{X,max}$ [$g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{X,max}$ [$\%_K$]	$\emptyset_{EKW}$ [$g_{EKW}\ g_X^{-1}$]	$\emptyset_{EKW}$ [$\%_K$]	P_{EKW} [$g_{EKW}\ L^{-1}\ d^{-1}$]	P_{EKW} [$\%_K$]
Showa	22	0,116 ± 0,008	80,55 ± 5,55	0,349 ± 0,038	75,87 ± 8,26	0,040 ± 0,004	61,12 ± 6,65
	24	0,128 ±0,009	88,88 ± 6,24	0,429 ± 0,025	93,26 ± 5,43	0,055 ± 0,003	82,90 ± 4,83
	26 (K)	0,144 ±0,011	100,00 ± 7,64	0,460 ± 0,021	100,00 ± 4,57	0,066 ± 0,003	100,00 ± 4,57
	28	0,166 ±0,012	115,28 ± 8,33	0,495 ± 0,017	107,61 ± 3,70	0,082 ± 0,003	124,05 ± 4,26
	30	0,152 ±0,006	105,55 ± 4,17	0,531 ± 0,020	115,43 ± 4,35	0,081 ± 0,003	121,85 ± 4,59
	32	0,107 ±0,014	74,33 ± 9,72	0,575 ± 0,027	125,00 ± 5,87	0,062 ± 0,003	92,88 ± 4,36
	34	0,060 ±0,011	41,67 ± 7,64	0,225 ± 0,029	48,91 ± 6,30	0,014 ± 0,002	20,38 ± 2,63
Bot22	22	0,109 ±0,010	76,22 ± 6,99	0,232 ± 0,028	53,33 ± 6,44	0,025 ± 0,003	40,65 ± 4,91
	24	0,126 ±0,006	88,11 ± 4,20	0,337 ± 0,030	77,47 ± 6,90	0,042 ± 0,004	68,26 ± 6,08
	26 (K)	0,143 ±0,008	100,00 ± 5,59	0,435 ± 0,023	100,00 ± 5,29	0,062 ± 0,003	100,00 ± 5,29
	28	0,161 ±0,009	112,59 ± 6,29	0,478 ± 0,031	109,89 ± 7,13	0,077 ± 0,005	123,72 ± 8,02
	30	0,167 ±0,010	116,78 ± 6,99	0,513 ± 0,050	117,93 ± 11,49	0,086 ± 0,008	137,72 ± 13,42
	32	0,154 ±0,005	107,69 ± 3,50	0,544 ± 0,027	125,06 ± 6,21	0,084 ± 0,00	134,68 ± 6,68
	34	0,148 ±0,004	103,50 ± 2,80	0,447 ± 0,031	102,76 ± 7,13	0,066 ± 0,005	106,35 ± 7,38

Mittelwerte ± SD (n = 3 biologische Replikate)

4.6.2 Hell-Dunkel-Zyklus

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei den untersuchten Hell/Dunkel-Zyklen von 12/12, 16/08, 20/04 und 24/00 (Abbildung 4-27 und Tabelle 4-15) lässt sich im Vergleich zur Kontrollkultur (H/D = 24/00) für beide Stämme ein geringeres Wachstum mit zunehmender Reduzierung der Beleuchtungsphase feststellen. Die Reduzierung der Beleuchtungsphase von täglich 24 h auf 20, 16 und 12 h führt bei dem Stamm Showa zu einer Verringerung der finalen Biomassekonzentration nach 28 Tagen Kultivierung um respektive 8, 16 und 47 % von 3,814 ± 0,011 $g_X\ L^{-1}$ auf respektive 3,494 ± 0,022, 3,190 ± 0,022 und 1,995 ± 0,007 $g_X\ L^{-1}$. Bei dem Stamm Bot22 führt die Reduzierung der Beleuchtungsphase zu einer Verringerung der finalen Biomassekonzentration nach 28 Tagen Kultivierung um respektive 20, 31 und 52 % von 3,760 ± 0,031 $g_X\ L^{-1}$ auf respektive 3,012 ± 0,093, 2,597 ± 0,038 und 1,812 ± 0,069 $g_X\ L^{-1}$.

Unter der, auf das Hell/Dunkel-Verhältnis bezogenen, optimalen Beleuchtungszeit von 24 h pro Tag ist kein wesentlicher Unterschied in der finalen Biomassekonzentration bei beiden Stämmen ersichtlich. Die Verringerung des Wachstums bei einer Reduzierung der Beleuchtungszeit spiegelt sich ebenfalls in der maximalen Biomasseproduktivität wider (Tabelle 4-15). Diese verringert sich für den Stamm Showa um ca. 8, 21 und 53 % bei Reduzierung der Beleuchtungszeit auf 20, 16 und 12 h pro Tag. Für den Stamm Bot22 fällt diese Verringerung noch stärker aus. Hier reduziert sich die maximale Biomasseproduktivität um 25, 30 und 60 % bei Reduzierung der Beleuchtungszeit auf 20, 16 und 12 h pro Tag. Bei optimalem Hell/Dunkel-Zyklus unterscheidet sich die maximale Biomasseproduktivität beider Stämme kaum.

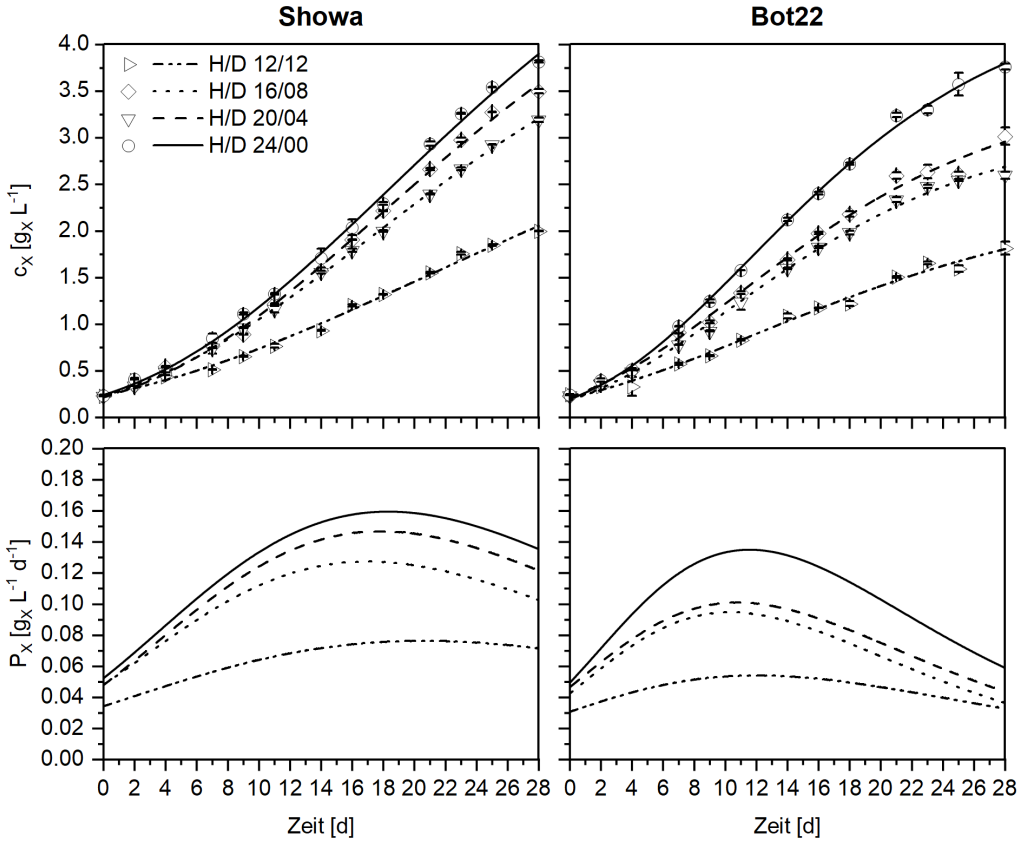


Abbildung 4-27: **Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 während der Kultivierung bei Hell/Dunkel-Zyklen von 12/12, 16/08, 20/04 und 24/00. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Betrachtet man die durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse (Abbildung 4-28), lässt sich für Showa (ANOVA, $F_{48,51} = 38{,}17$, $p < 0{,}05$), als auch für Bot22 (ANOVA, $F_{48,51} = 88{,}01$, $p < 0{,}05$) ein signifikanter Anstieg mit steigender Beleuchtungsdauer feststellen. Für beide Stämme konnte der höchste durchschnittliche

Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen mit 0,452 ± 0,016 g_{EKW} g_X^{-1} (Showa) und mit 0,441 ± 0,023 g_{EKW} g_X^{-1} (Bot22) bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 detektiert werden (Tabelle 4-15). Setzt man die maximale Biomasseproduktivät mit dem Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen als Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ins Verhältnis, dann liegt das Optimum der Beleuchtunsgzeit bei beiden Stämmen bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 (Tabelle 4-15). Eine Reduzierung der Beleuchtungszeit führt bei beiden Stämme zu einer Reduzierung der Kohlenwasserstoffproduktivität.

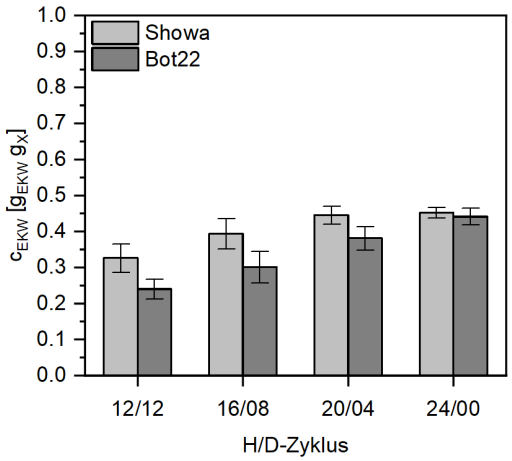


Abbildung 4-28: **Darstellung der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei Hell/Dunkel-Zyklen von 12/12, 16/08, 20/04 und 24/00. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Tabelle 4-15: **Vergleich der Kultivierung der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 bei Hell/Dunkel-Zyklen von 12/12, 16/08, 20/04 und 24/00.**

Stamm	H/D [°C]	$P_{X,max}$ [g_X L^{-1} d^{-1}]	$P_{X,max}$ [%K]	$\emptyset_{EKW}$ [g_{EKW} g_X^{-1}]	$\emptyset_{EKW}$ [%K]	P_{EKW} [g_{EKW} L^{-1} d^{-1}]	P_{EKW} [%K]
Showa	12/12	0,076 ± 0,011	47,50 ± 6,88	0,326 ± 0,040	72,12 ± 8,85	0,025 ± 0,003	34,26 ± 4,20
	16/08	0,127 ±0,009	79,38 ± 5,63	0,394 ± 0,042	87,17 ± 9,29	0,050 ± 0,005	69,19 ± 7,38
	20/04	0,147 ±0,011	91,88 ± 6,88	0,445 ± 0,025	98,45 ± 5,53	0,065 ± 0,004	90,45 ± 5,08
	24/00 (K)	0,160 ±0,010	100,00 ± 6,25	0,452 ± 0,016	100,00 ± 3,54	0,072 ± 0,003	100,00 ± 3,54
Bot22	12/12	0,067 ±0,006	39,64 ± 3,55	0,240 ± 0,028	54,42 ± 6,35	0,016 ± 0,002	21,58 ± 2,52
	16/08	0,118 ±0,011	69,82 ± 6,51	0,301 ± 0,043	68,25 ± 9,75	0,036 ± 0,005	47,66 ± 6,81
	20/04	0,126 ±0,014	74,56 ± 8,28	0,381 ± 0,033	86,39 ± 7,48	0,048 ± 0,004	64,41 ± 5,58
	24/00 (K)	0,169 ±0,015	100,00 ± 8,88	0,441 ± 0,023	100,00 ± 5,22	0,075 ± 0,004	100,00 ± 5,22

Mittelwerte ± SD (n = 3 biologische Replikate)

4.6.3 Nährstoffe

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der Variation der Nährmedienkomponenten Stickstoff, Phosphor, Magnesium, Calcium und Eisen auf das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 sind in Abbildung 4-29 bis Abbildung 4-33 sowie in Tabelle 4-16 dargestellt. Vergleicht man das Wachstum der beiden Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Stickstoffkonzentration im Nährmedium (Abbildung 4-29), lässt sich im Vergleich zur Kontrollkultur ein schnelleres Wachstum durch Reduzierung der initialen Stickstoffkonzentration feststellen. Bei Showa führt eine Reduzierung der initialen Stickstoffkonzentration zu einer Erhöhung der finalen Biomassekonzentration von 3,100 ± 0,011 $g_X\ L^{-1}$ um 7 % auf 3,335 ± 0,019 $g_X\ L^{-1}$. Bei der Verringerung der Stickstoffkonzentration auf 25 % des Kontrollwertes erhöht sich die finale Biomassekonzentration um 9 % auf 3,417 ± 0,014 $g_X\ L^{-1}$. Bei Bot22 erhöht sich die finale Biomassekonzentration von 3,550 ± 0,152 $g_X\ L^{-1}$ um ebenfalls 7 % auf 3,829 ± 0,042 $g_X\ L^{-1}$ bei der Hälfte an Stickstoff im Medium, reduziert sich aber um 4 % auf 3,392 ± 0,021 $g_X\ L^{-1}$ bei einem Viertel der initialen Stickstoffkonzentration. Ein ähnliches Bild für beide Stämme ergibt sich bei der Biomasseproduktivität (Tabelle 4-16).

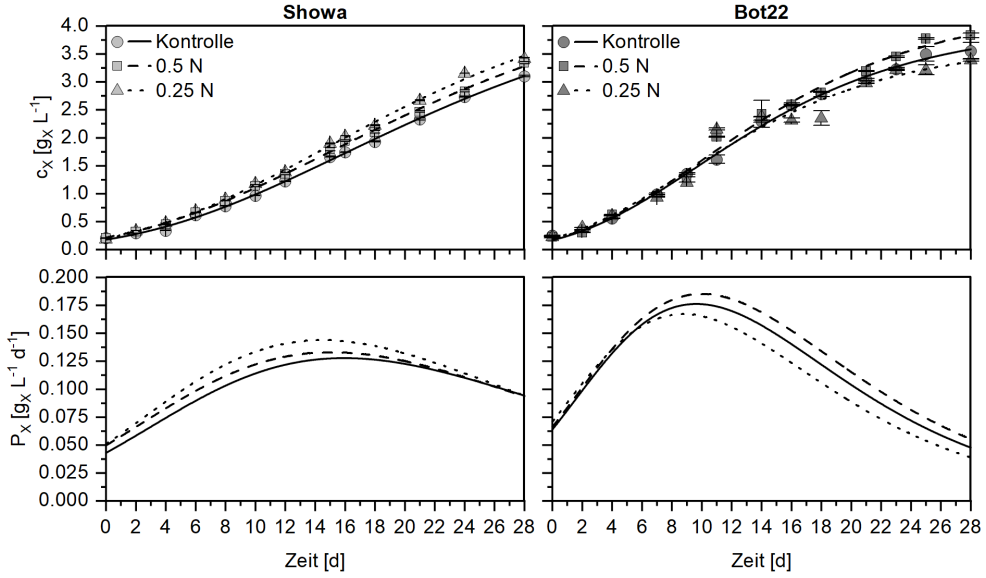


Abbildung 4-29: Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Stickstoffkonzentration. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).

Betrachtet man den durchschnittlichen Kohlenwasserstoffgehalt in der Biomasse (Abbildung 4-34), ist bei beiden Stämmen durch Reduzierung der initialen Stickstoffkonzentration auf die Hälfte, eine Steigerung der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen von 2 % für Showa und um 7 % für den Stamm Bot22 ersichtlich. Bei einem Viertel der

Ausgangskonzentration an Stickstoff ist eine Verringerung der Kohlenwasserstoffkonzentration um 12 % für den Stamm Showa und eine leichte Steigerung (3,5 %) für den Stamm Bot22 erkennbar. Hinsichtlich der Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe konnte durch Reduzierung der Stickstoffkonzentration auf die Hälfte der Kontrollkonzentration eine Steigerung von 6 % für den Stamm Showa bzw. 12 % Bot22 gemessen werden. Eine Reduzierung auf ein Viertel der initialen Stickstoffkonzentration führte zu keiner positiven Auswirkung auf die Kohlenwasserstoffproduktivität bei beiden Stämmen.

Betrachtet man das Wachstum unter Variation der Phosphorkonzentration im Nährmedium (Abbildung 4-30), lässt sich durch Verringerung der initialen Konzentration auf die Hälfte bei beiden Stämmen kein positiver Einfluss auf Wachstum, Kohlenwasserstoff- und Kohlenwasserstoffproduktivität beobachten.

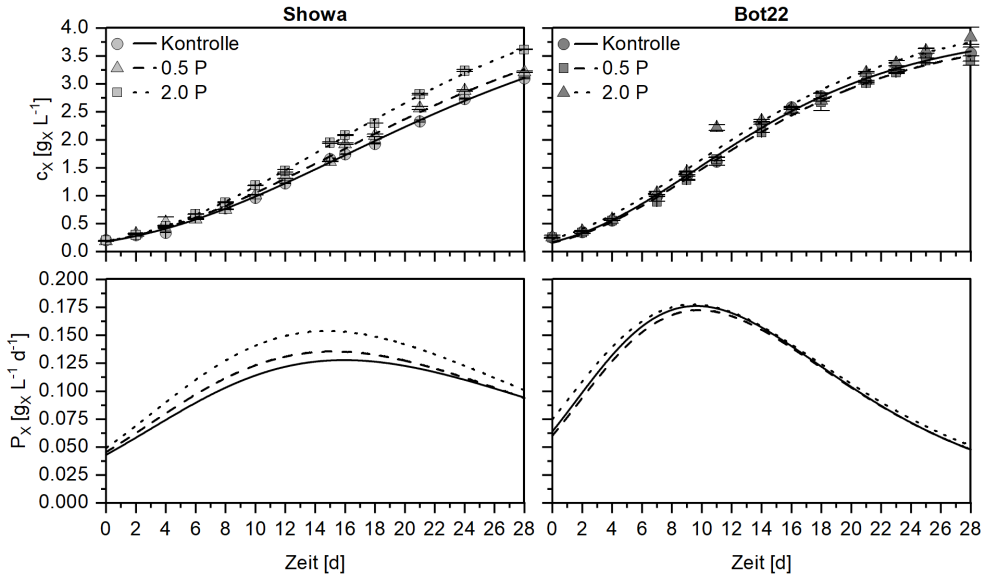


Abbildung 4-30: **Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Phosphorkonzentration. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Eine Verdopplung der Konzentration an Phosphor im Medium führt hingegen zu einer Steigerung der finalen Biomassekonzentration bei beiden Stämmen von 3,100 ± 0,011 g_X L^{-1} um 16 % auf 3,611 ± 0,003 g_X L^{-1} für Showa und von 3,100 ± 0,011 g_X L^{-1} um 8 % auf 3,833 ± 0,178 g_X L^{-1} für Bot22. Für die Biomasseproduktivität (Tabelle 4-16) ergibt sich eine Steigerung um ca. 20 % für den Stamm Showa, jedoch keine Veränderung für Bot22 bei einer Verdopplung der Phosphorkonzentration im Medium. Betrachtet man den durchschnittlichen Kohlenwasserstoffgehalt in der Biomasse (Abbildung 4-34), ist bei beiden Stämmen eine Steigerung der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen von über 10 % bei

Verdopplung der Phosphorkonzentration erkennbar. Hinsichtlich der Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe konnte durch Verdopplung der Phosphorkonzentration eine Steigerung von 34 % (Showa) bzw. 10 % (Bot22) gemessen werden.

Vergleicht man den Einfluss der Variation der Calciumkonzentration auf beide *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 (Abbildung 4-31), lässt sich durch Verdopplung der initialen Konzentration im Nährmedium kein positiver Effekt auf Wachstum, Kohlenwasserstoffkonzentration und -produktivität erkennen. Eine Eliminierung von Calcium im Nährmedium führt bei beiden Stämmen zu einer Steigerung der maximalen Biomasseproduktivität von 7 % für den Stamm Showa und 3 % für den Stamm Bot22 (Tabelle 4-16). Für die Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ist bei Eliminierung von Calcium eine Steigerung von mindestens 10 % bei beiden Stämmen detektierbar (Abbildung 4-34). Dies führt zu einer Steigerung der Kohlenwasserstoffproduktivität um 18 % für den Stamm Showa und 16 % für den Stamm Bot22.

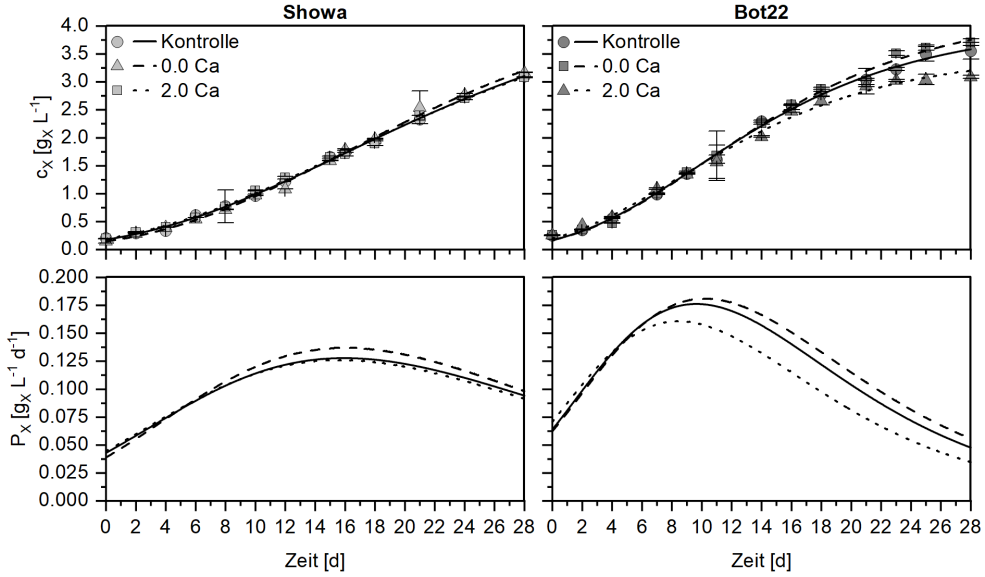


Abbildung 4-31: Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Calciumkonzentration. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Magnesiumkonzentration im Nährmedium (Abbildung 4-32), lässt sich im Vergleich zur Kontrollkultur ein besseres Wachstum durch Reduzierung der initialen Magnesiumkonzentration feststellen. Bei dem Stamm Showa führt eine Reduzierung der initialen Magnesiumkonzentration zu einer Erhöhung der finalen Biomassekonzentration von 3,100 ± 0,011 g_X L^{-1} um 13 % auf 3,504 ± 0,014 g_X L^{-1}. Eine Verdopplung der Magnesiumkonzentration führt zu einer Verringerung der finalen Biomassekonzentration um

12 % auf 3,273 ± 0,010 $g_X L^{-1}$. Bei dem Stamm Bot22 war keine Erhöhung der finalen Biomassekonzentration sowohl bei Halbierung als auch bei Verdopplung der Magnesiumkonzentration detektierbar. Für die maximale Biomasseproduktivität ist für Bot22 jedoch eine Erhöhung um 7 % bei Verdopplung und eine Erhöhung um 11 % bei Halbierung der Magnesiumkonzentration zu verzeichnen. Eine Steigerung der maximalen Biomasseproduktivität bei Showa um 16 % ist nur bei Halbierung der Magnesiumkonzentration ersichtlich, wohingegen eine Verdopplung an Magnesium zur Reduzierung der Biomasseproduktivität um 14 % führt (Tabelle 4-16). Betrachtet man den durchschnittlichen Kohlenwasserstoffgehalt in der Biomasse (Abbildung 4-34), ist bei beiden Stämmen sowohl durch Verdopplung als auch durch Halbierung der Magnesiumkonzentration eine Steigerung festzustellen. Hinsichtlich der Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe konnte durch Halbierung der Magnesiumkonzentration eine Steigerung von 34 % für Showa bzw. 16 % für Bot22 gemessen werden. Die Verdopplung der initialen Magnesiumkonzentration führte nur bei dem Stamm Bot22 zu einem positiven Einfluss mit einer Steigerung der Kohlenwasserstoffproduktivität von 19 %.

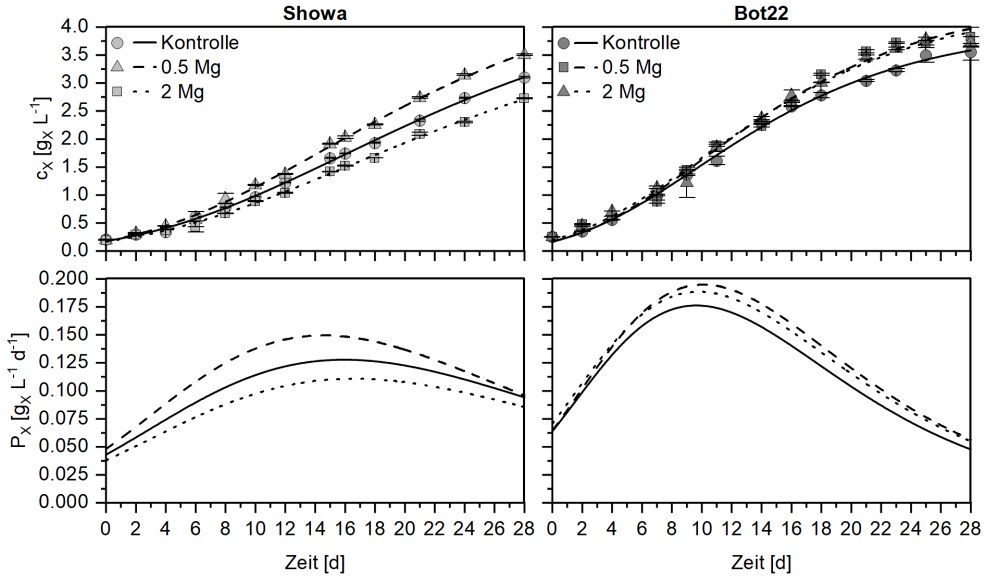


Abbildung 4-32: Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Magnesiumkonzentration. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).

Betrachtet man den Einfluss der Variation der Eisenkonzentration im Nährmedium (Abbildung 4-33), lässt sich durch Verringerung der initialen Konzentration auf die Hälfte, bei beiden Stämmen kein positiver Einfluss auf Wachstum, Kohlenwasserstoffkonzentration und Kohlenwasserstoffproduktivität beobachten. Eine Verdopplung der Eisenkonzentration im Medium führt zwar zu einer Steigerung der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe,

jedoch auch zu einer Reduzierung des Wachstums und damit verbunden, zu keinem positiven Einfluss auf die Kohlenwasserstoffproduktivität.

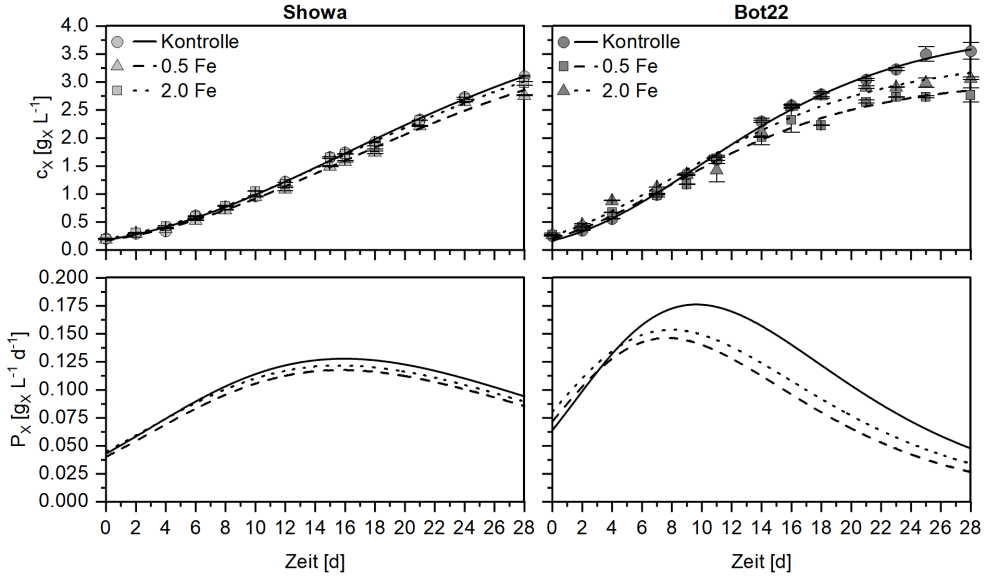


Abbildung 4-33: **Vergleich der Biomassekonzentration (oben) und der volumetrischen Biomasseproduktivität (unten) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Eisenkonzentration. Darstellung als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

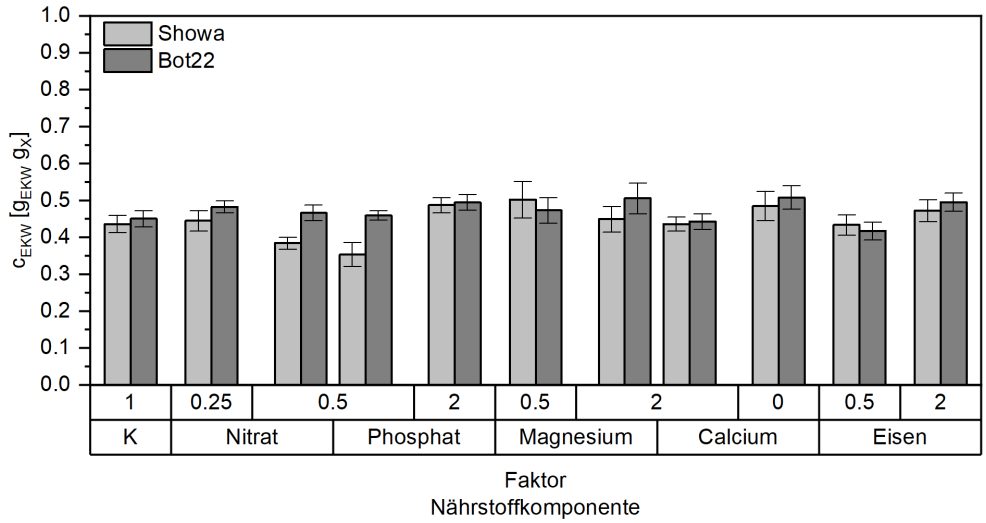


Abbildung 4-34: **Darstellung der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 für die Kultivierung unter Variation der Medienkomponenten Nitrat, Phosphat, Magnesium, Calcium und Eisen. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

Tabelle 4-16: **Vergleich der Biomasseproduktivität sowie der Konzentration und Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter Variation der Nährstoffbedingungen.**

Stamm	Nährstoff	Faktor	$P_{X,max}$ $[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	$P_{X,max}$ $[\%_K]$	$\emptyset_{EKW}$ $[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	$\emptyset_{EKW}$ $[\%_K]$	P_{EKW} $[g_{EKW}\ L^{-1}\ d^{-1}]$	P_{EKW} $[\%_K]$
Showa	K	1,00	0,128 ± 0,008	100,00 ± 6,25	0,436 ± 0,024	100,00 ± 5,50	0,056 ± 0,003	100,00 ± 5,50
	N	0,50	0,133 ± 0,009	103,91 ± 7,03	0,445 ± 0,027	102,06 ± 6,19	0,059 ± 0,004	106,05 ± 6,43
		0,25	0,144 ±0,009	112,50 ± 7,03	0,384 ± 0,016	88,07 ± 3,67	0,055 ± 0,002	99,08 ± 4,13
	P	0,50	0,135 ±0,012	105,47 ± 9,38	0,353 ± 0,033	80,96 ± 7,57	0,048 ± 0,004	85,39 ± 7,98
		2,00	0,154 ±0,002	120,31 ± 1,56	0,487 ± 0,021	111,70 ± 4,82	0,075 ± 0,003	134,39 ± 5,79
	Mg	0,50	0,149 ±0,008	116,41 ± 6,25	0,502 ± 0,050	115,14 ± 11,47	0,075 ± 0,007	134,03 ± 13,35
		2,00	0,110 ±0,006	85,94 ± 4,69	0,481 ± 0,040	110,32 ± 9,17	0,053 ± 0,004	94,81 ± 7,88
	Ca	0,00	0,137 ±0,003	107,03 ± 2,34	0,484 ± 0,040	111,01 ± 9,17	0,066 ± 0,005	118,81 ± 9,82
		2,00	0,126 ±0,004	98,44 ± 3,13	0,436 ± 0,018	100,00 ± 4,13	0,055 ± 0,002	98,44 ± 4,06
	Fe	0,50	0,117 ±0,004	91,41 ± 3,13	0,434 ± 0,027	99,54 ± 6,19	0,051 ± 0,003	90,99 ± 5,66
		2,00	0,122 ±0,003	95,31 ± 2,34	0,472 ± 0,030	108,26 ± 6,88	0,058 ± 0,004	103,18 ± 6,56
Bot22	K	1,00	0,176 ± 0,006	100,00 ± 3,41	0,450 ± 0,022	100,00 ± 4,89	0,079 ± 0,004	100,00 ± 4,89
	N	0,50	0,185 ± 0,009	105,11 ± 5,11	0,483 ± 0,016	107,33 ± 3,56	0,089 ± 0,003	112,82 ± 3,74
		0,25	0,166 ±0,009	94,32 ± 5,11	0,466 ± 0,022	103,56 ± 4,89	0,077 ± 0,004	97,67 ± 4,61
	P	0,50	0,172 ±0,012	97,73 ± 6,82	0,459 ± 0,013	102,00 ± 2,89	0,079 ± 0,002	99,68 ± 2,82
		2,00	0,177 ±0,004	100,57 ± 2,27	0,494 ± 0,021	109,78 ± 4,67	0,087 ± 0,004	110,40 ± 4,69
	Mg	0,50	0,195 ±0,009	110,80 ± 5,11	0,473 ± 0,035	105,11 ± 7,78	0,092 ± 0,007	116,46 ± 8,62
		2,00	0,188 ±0,004	106,82 ± 2,27	0,505 ± 0,042	112,22 ± 9,33	0,095 ± 0,008	119,87 ± 9,97
	Ca	0,00	0,181 ±0,003	102,84 ± 1,70	0,508 ± 0,031	112,89 ± 6,89	0,092 ± 0,006	116,10 ± 7,08
		2,00	0,161 ±0,004	91,48 ± 2,27	0,442 ± 0,022	98,22 ± 4,89	0,071 ± 0,004	89,85 ± 4,47
	Fe	0,50	0,146 ±0,004	82,95 ± 2,27	0,417 ± 0,024	92,67 ± 5,33	0,061 ± 0,004	76,87 ± 4,42
		2,00	0,153 ±0,009	86,93 ± 5,11	0,495 ± 0,025	110,00 ± 5,56	0,076 ± 0,004	95,63 ± 4,83

Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate)

4.6.4 Kultivierung unter optimierten Bedingungen

Für die Zusammenführung der in den vorangegangen Abschnitten durchgeführten Experimente zum Einfluss der Temperatur, des Hell/Dunkel-Zyklus und der einzelnen Nährmedienkomponenten wurden die beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter der jeweils als optimal ermittelten Temperatur von 28 °C (Showa) und 30 °C (Bot222), einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 und der in Abschnitt 3.2.2.3 und Tabelle 3-4 aufgeführten Medienzusammensetzung kultiviert. Die Ergebnisse im Vergleich zu einer Kontrollkultur bei 26 °C, H/D = 24/00 und BG11-Medium wurden in Abbildung 4-35, Abbildung 4-36 und Tabelle 4-17 dargestellt.

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Botryococcus braunii* Stämme unter optimierten- und Kontrollbedingungen, lässt sich im Vergleich zur Kontrollkultur für beide Stämme ein deutlich besseres Wachstum feststellen. Nach 28 Tagen Kultivierung liegt die Biomassekonzentration für den Stamm Showa unter optimierten Bedingungen mit 3,787 ± 0,032 $g_X\,L^{-1}$ um 21 % über der Biomassekonzentration der Kontrollkultur mit 3,130 ± 0,080. Bei dem Stamm Bot22 lag die finale Biomassekonzentration nach 28 Tagen Kultivierung mit 3,793 ± 0,013 $g_X\,L^{-1}$ ca. 25 % über der Kontrollkultur mit 3,198 ± 0,058 $g_X\,L^{-1}$. Diese Beobachtung der finalen Biomassekonzentration spiegelt sich ebenfalls in der maximalen Biomasseproduktivität wider. Diese liegt für den Stamm Showa unter optimierten Bedingungen 22 % über der Kontrollkultur. Die maximale Biomasseproduktivität für den Stamm Bot22 lag ca. 34 % über der der Kontrollkultur. Untereinander unterscheidet sich die maximale Biomasseproduktivität unter optimierten Bedingungen des Stammes Showa mit 0,184 ± 0,011 $g_X\,L^{-1}\,d^{-1}$ lediglich um 2 % von der des Stammes Bot22 mit 0,180 ± 0,07 $g_X\,L^{-1}\,d^{-1}$. Die maximale Biomasseproduktivität wird bei beiden Stämmen unter optimierten Bedingungen bei einer Biomassekonzentration von ca. 1,5 $g_X\,L^{-1}$ zwischen Kultivierungstag 7 und 9 erreicht.

Betrachtet man die durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse (Abbildung 4-36), lässt sich für beide Stämme eine signifikant höhere Konzentration unter optimierten Bedingungen feststellen (ANOVA, $F_{48,51}$ = 128,22, $p < 0,05$). Für den Stamm Showa konnte im Vergleich zur Kontrolle unter optimierten Bedingungen eine Steigerung des durchschnittlichen Gehaltes an extrazellulären Kohlenwasserstoffen von 43 % und für den Stamm Bot22 um 40 % detektiert werden (Tabelle 4-17). Bei dem Vergleich beider Stämme untereinander, ist sowohl unter Kontroll- (ANOVA, $F_{48,51}$ = 128,22, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, t = 1,16, p = 0,25), als auch unter optimierten Bedingungen kein signifikanter Unterschied der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse festzustellen (ANOVA, $F_{48,51}$ = 128,22, $p < 0,05$/ Holm-Sidak, t = 0,582, p = 0,563). Setzt man

die maximale Biomasseproduktivät mit dem Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen als Produktivität extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ins Verhältnis, dann konnte im Vergleich zur Kontrollkultur eine Steigerung von 72 % für den Stamm Showa und 87 % für den Stamm Bot22 für die Kultivierung unter optimierten Bedingungen ermittelt werden (Tabelle 4-14). Die Kohlenwasserstoffproduktivität für beide Stämme lag mit 0,120 ± 0,004 g_{EKW} L^{-1} d^{-1} für den Stamm Bot22 und mit 0,122 ± 0,009 g_{EKW} L^{-1} d^{-1} für Showa unter optimierten Bedingungen gleich auf.

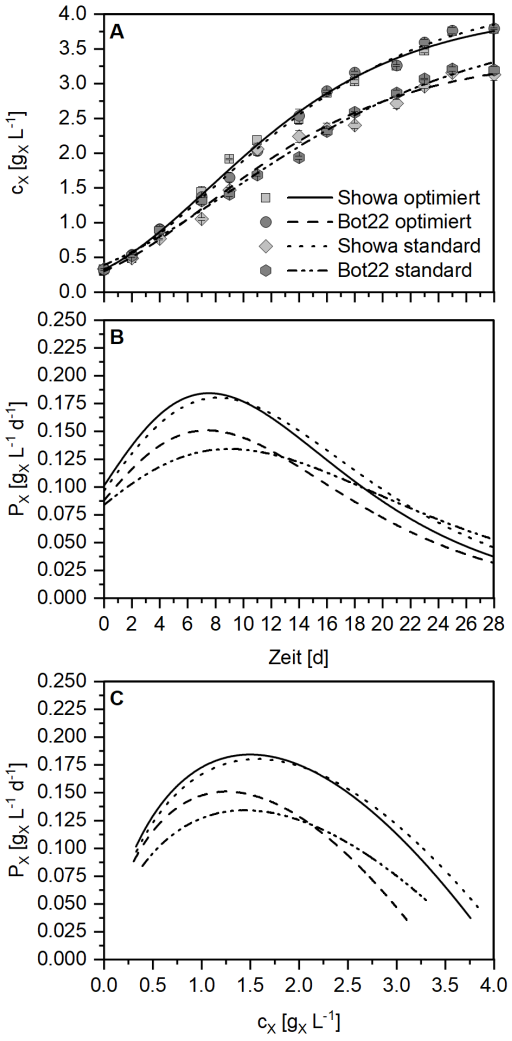


Abbildung 4-35: **Darstellung der Biomassekonzentration in Abhängigkeit der Kultivierungszeit (A), der volumetrischen Biomasseproduktivität in Abhängigkeit der Kultivierungszeit (B) und der volumetrischen Biomasseproduktivität in Abhängigkeit der Biomassekonzentration (C) der Stämme Showa und Bot22 unter nichtoptimierten und optimierten Kultivierungsbedingungen. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate).**

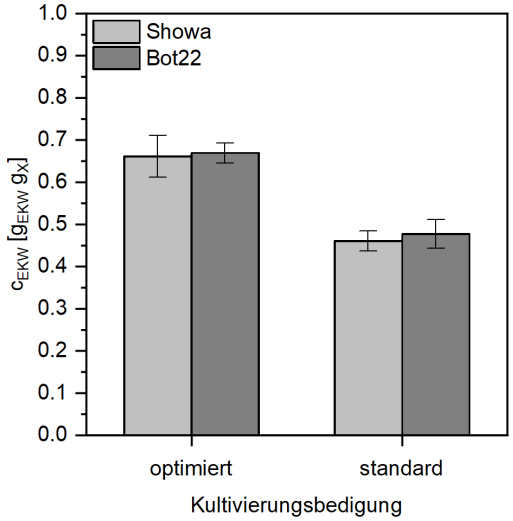


Abbildung 4-36: **Vergleich der durchschnittlichen Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen unter nichtoptimierten und optimierten Kultivierungsbedingungen der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate)**

Tabelle 4-17: **Vergleich der Biomasseproduktivität sowie der Konzentration und Produktivität an extrazellulären Kohlenwasserstoffen der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 unter nichtoptimierten und optimierten Kultivierungsbedingungen.**

	Stamm	$P_{X,max}$ [$g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$]	$P_{X,max}$ [%K]	$\emptyset_{EKW}$ [$g_{EKW}\ g_X^{-1}$]	$\emptyset_{EKW}$ [%K]	P_{EKW} [$g_{EKW}\ L^{-1}\ d^{-1}$]	P_{EKW} [%K]
Showa	**Kontrolle**	0,151 ± 0,012	100,00 ± 7,94	0,461 ± 0,024	100,00 ± 5,21	0,070 ± 0,004	100,00 ± 5,71
	Optimiert	0,184 ± 0,011	121,85 ± 7,28	0,661 ± 0,050	143,38 ± 10,84	0,122 ± 0,009	174,29 ± 12,85
Bot22	**Kontrolle**	0,134 ± 0,006	100,00 ± 4,47	0,477 ± 0,034	100,00 ± 7,12	0,064 ± 0,005	100,00 ± 7,81
	Optimiert	0,180 ± 0,007	134,32 ± 5,22	0,669 ± 0,024	140,25 ± 5,03	0,120 ± 0,004	187,50 ± 6,25

Mittelwert ± SD (n = 3 biologische Replikate)

4.7 Langzeit *in situ*-Extraktion des Stammes Showa in 6,0 L Flat-Panel Airlift-Reaktoren unter optimierten Kultivierungs- und Extraktionsbedingungen

Die Zusammenführung der in den vorherigen Abschnitten vorgenommenen Optimierungen der Kultivierungsbedingungen und dem Verfahren der *in situ*-Extraktion erfolgte anhand der Durchführung einer Langzeit-*in situ*-Extraktion des Stammes Showa in 6,0 L-FPA-Reaktoren über 80 Tage.

Die Ergebnisse zur *in situ*-Extraktion unter optimierten Bedingungen des Stammes Showa über 80 Tage sind in Abbildung 4-37 sowie vergleichend mit der *in situ*-Extraktionen im 6,0 L FPA-Reaktor unter Standardbedingungen in Tabelle 4-18 dargestellt. Aus Abbildung 4-37A ist keine wesentliche Zu- oder Abnahme der Biomassekonzentration über den Verlauf der Extraktion ersichtlich. Bei einer durchschnittlichen Biomassekonzentration von 2,636 ± 0,145 $g_X\ L^{-1}$ wurde während der Extraktion eine maximale Biomassekonzentration von 2,929 ± 0,005 $g_X\ L^{-1}$ und eine minimale Biomassekonzentration von 2,381 ± 0,079 $g_X\ L^{-1}$ detektiert. Die durchschnittliche Biomasseproduktivität während der *in situ*-Extraktion über 80 Tage wurde mit 0,002 ± 0,112 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ ermittelt. Damit ergibt sich bezüglich der Biomasseproduktivität zwischen den in Tabelle 4-18 verglichenen Extraktionen kein signifikanter Unterschied (ANOVA, $F_{123,124} = 0{,}0233$, $p = 0{,}879$). Es lässt sich kein klarer Abfall bzw. Anstieg der Biomasseproduktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt der 80-tägigen *in situ*-Extraktionen erkennen.

Betrachtet man den Mittelwert der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse (Tabelle 4-18), lässt sich mit 0,496 ± 0,055 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ unter optimierten Bedingungen eine um 8,5 % signifikant höhere durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse feststellen. Im Verlauf der 80-tägigen Extraktion unter optimalen Bedingungen konnten anhand der Standardabweichung von 0,055 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ eine maximale und minimale Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse von 0,606 ± 0,006 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ und 0,403 ±0,030 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ detektiert werden. Unterteilt man die Versuchsdauer von 80 Tagen zur besseren Betrachtung in 4 gleich lange Bereiche: A (Tag 1 bis 20), B (Tag 21 bis 40), C (Tag 41 bis 60) und D (Tag 61 bis 80), lässt sich durch Bildung der Mittelwerte der Kohlenwasserstoffkonzentration in dem jeweiligen Bereich eine signifikante Abnahme der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse von durchschnittlich 0,531 ± 0,044 (A) über 0,525 ± 0,044 (B) über 0,473 ± 0,048 zu 0,458 ± 0,047 $g_{EKW}\ g_X^{-1}$ feststellen (ANOVA, $F_{76,79} = 12{,}5$, $p < 0{,}05$). Damit reduzierte sich der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse von Anfang zu Ende der 80-tägigen *in situ*-Extraktionen um ca. 14 %.

Für die biomassespezifische Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen, konnte im Vergleich zur Extraktion unter Standardbedingungen bei der Extraktion unter optimierten Bedingungen eine um ca. 18 % höhere Produktivität festgestellt werden. Dabei unterscheidet sich die biomassespezifische Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe zwischen den beiden Extraktionen signifikant (ANOVA, $F_{123,124} = 155,93$, $p < 0,05$). Rechnet man die Gesamtausbeute über die 45 Tage *in situ*-Extraktion unter Standardbedingungen auf die Dauer von 80 Tagen der *in situ*-Extraktion unter optimierten Bedingungen hoch, konnte durch die Optimierung von Kultivierung und Extraktion eine Steigerung der Gesamtausbeute an Kohlenwasserstoffen um 21 % von 2,738 ± 0,414 g_{KW} L^{-1} auf 3,311 ± 0,503 g_{KW} L^{-1} erreicht werden. Bezogen auf die durchschnittliche Konzentration an Biomasse im Kultivierungssystem konnten über 80 Tage unter Zusammenführung aller Optimierungen 125,60 % der Biomasse als Kohlenwasserstoffe extrahiert werden, wohingegen unter nicht-optimierten Bedingungen ca. 106,61 % der durchschnittlichen Biomasse im System als Kohlenwasserstoffe extrahiert werden konnten.

Tabelle 4-18: **Vergleich der ermittelten Kennzahlen von Kultivierung und Extraktion während 80-tägiger *in situ*-Extraktion unter Zusammenführung aller Optimierungen des *Botryococcus braunii* Stammes Showa im 6,0 L FPA-Reaktor im Vergleich zur *in situ*-Extraktion 6,0 L FPA-Reaktor unter Standardbedingungen.**

Extraktion		6,0 L FPA-Reaktor Standard	6,0 L FPA-Reaktor Optimiert
$c_{X,Start}$	$[g_X\ L^{-1}]$	2,437 ± 0,001	2,533 ± 0,091
$\emptyset_X$	$[g_X\ L^{-1}]$	2,568 ± 0,165	2,636 ± 0,145
P_X	$[g_X\ L^{-1}\ d^{-1}]$	-0,003 ± 0,110	0,002 ± 0,112
$\emptyset_{EKW}$	$[g_{EKW}\ g_X^{-1}]$	0,468 ± 0,041	0,496 ± 0,055
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}]$	34,230 ± 5,180	41,380 ± 6,283
$P_{KW,EXT}$	$[mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}]$	13,360 ± 1,980	15,721 ± 2,190
$Y_{KW,EXT}$	$[g_{KW}\ L^{-1}]$	*2,738 ± 0,414	3,311 ± 0,503
$Y_{KW,EXT}$	$[\%_{\emptyset_X}]$	*106,61	125,60

Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten resultierend aus 2 biologischen Replikaten
*Hochrechnung auf 80 Tage *in situ*-Extraktion

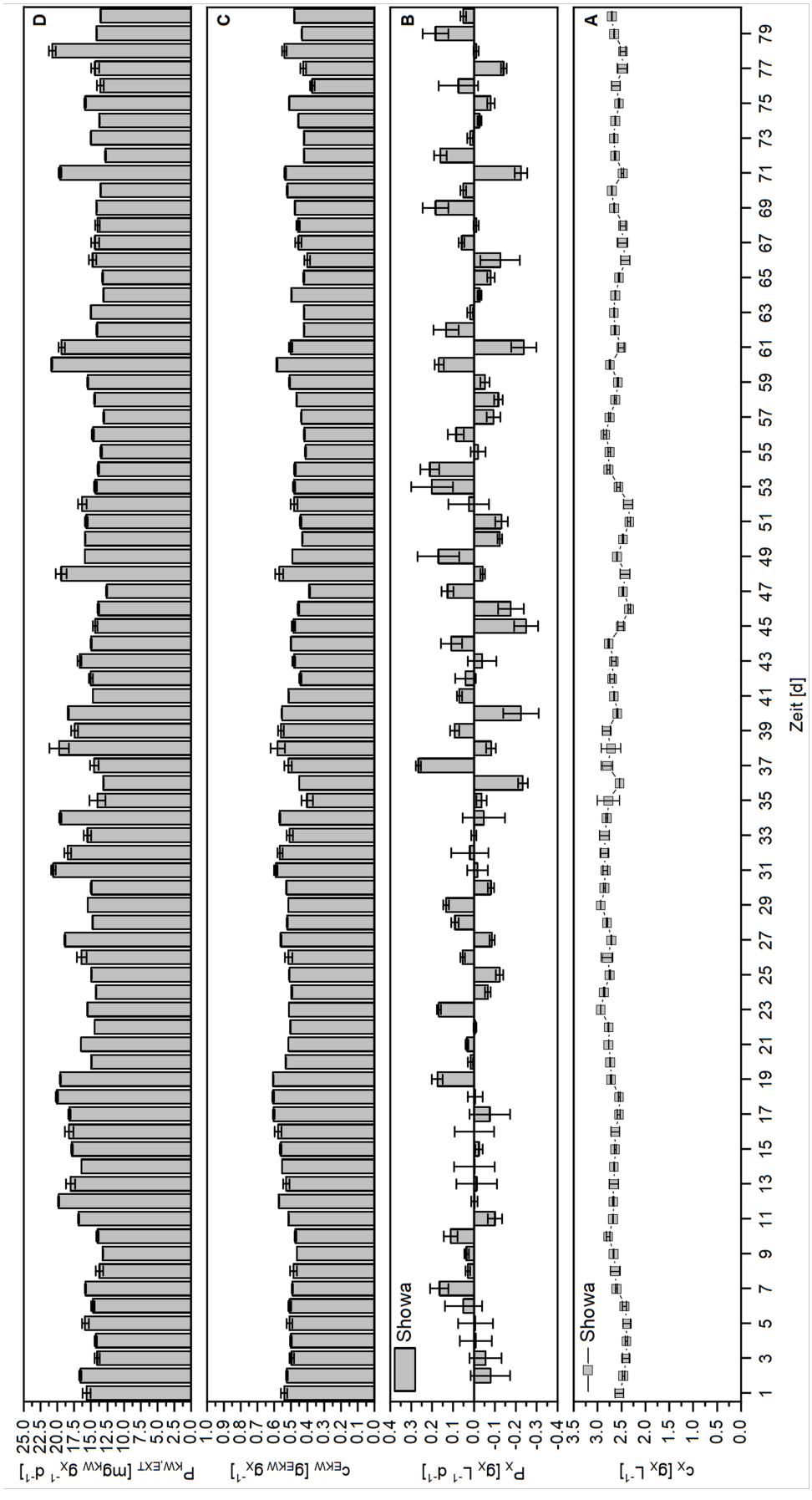


Abbildung 4-37: Darstellung der Biomassekonzentration (A), der volumetrischen Biomasseproduktivität (B), des Kohlenwasserstoffgehaltes (C) und der Kohlenwasserstoffproduktivität (D) über 80 Tage *in situ*-Extraktion des *Botryococcus braunii* Stammes Showa. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten resultierend aus 2 biologischen Replikaten.

5 Diskussion

5.1 Phylogenetische Analyse von *Botryococcus braunii*

Die Grundlage für die taxonomische Bestimmung von Mikroorganismen basiert, traditionell auf dem Vergleich morphologischer Eigenschaften, welche im Auge des Betrachters liegen, anhand schwankender Umwelteinflüsse mit einer Variation einhergehen und damit zu einer fehlerhaften taxonomischen Einordnung führen können (Coleman 2009). Eine wesentlich präzisere taxonomische Einordung erlauben molekularbiologische Methoden anhand der Analyse spezieller Regionen der DNA der jeweiligen Organsimen (Coleman 2009). Eine dieser speziellen Regionen stellt die kleine Untereinheit (SSU) der ribosomalen RNA (rRNA) dar (Hegedűs et al. 2016). Für die Mikroalge *Botryococcus braunii* konnte, basierend auf der Analyse der SSU rRNA, eine Aufteilung in zwei Abstammungslinien ermittelt werden, welche sich mit der chemischen Struktur der gebildeten Kohlenwasserstoffe der Races A und B/L/S überlagert (Senousy et al. 2004; Weiss et al. 2011). Durch Kawachi et al. 2012 wurde diese Feststellung bekräftigt und ermittelt, dass jeder der Clades, welche die Races B und L/S repräsentieren, in zwei Subclades aufgeteilt ist. Diese Aufspaltung in die Subclades B1, B2, L1 und L/S2 (Kawachi et al. 2012) der Abstammungslinien überschreitet damit die Überführung der chemischen Klassifizierung (Races) von *Botryococcus braunii* anhand der gebildeten Kohlenwasserstoffe auf die taxonomische Klassifizierung basierend auf der SSU rRNA (Hegedűs et al. 2016).

Ein weiterer Abschnitt der RNA, welcher für die Klassifizierung von Organismen geeignet ist, wird in der Region des Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) gesehen (Coleman 2009). Dieser für Chlorophyta 128 bis 483 Basen umfassende Sequenzabschnitt (Buchheim et al. 2011) der DNA befindet sich zwischen der 5,8S- und der 28S rRNA (Choudhary et al. 2015) und liegt innerhalb einer Spezies sehr konserviert, aber zwischen verschiedenen Spezies sehr variabel vor (Chen et al. 2010b). Ein weiterer Vorteil der Nutzung dieses Markers liegt in der Analyse der Sekundärstruktur der Sequenz, welche bei Eukaryoten 4 Helices ausbildet und sehr gut mit der taxonomischen Einordnung korreliert (Coleman 2000). Durch das Vorkommen sogenannter Compensatory Base Changes (CBCs) und hemi-CBCs in der Sekundärstruktur der ITS2-Region lassen sich für Eukaryoten bereits bei einer einzeln auftretenden CBC in Helix III der ITS2-Region verschiedene Spezies differenzieren (Müller et al. 2007), da diese im Falle einer sexuellen Fortpflanzung nicht mehr in der Lage sind, sich miteinander zu kreuzen.

Hegedűs et al. 2016 haben die ITS2-Sequenzen von diversen *Botryococcus braunii* Stämmen der Races A, B und L analysiert und konnten, wie zuvor durch die Analyse der 18S rRNA, eine Aufteilung der B-Race und L-Race Stämme in jeweils zwei Subclades bestätigen. Entgegen den Analysen der 18S rRNA konnte bezüglich der ITS2-Region für die Stämme der A-Race

ebenfalls eine Zuordnung der Stämme zu zwei Subclades festgestellt werden. Hegedűs et al. 2016 konnten über die Analyse der Sekundärstruktur innerhalb der A-Race eine einzelne CBC (Helix IV), innerhalb der B-Race drei CBCs (Helix II und III) und innerhalb der Race L bis zu vier CBCs (Helix II bis IV) ermitteln. Dabei sind nach Coleman 2009 die Sequenzregionen der Helices II und III im Vergleich zu den Helices I und IV wesentlich funktioneller, konservierter und von großer Wichtigkeit für die erfolgreiche Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ITS2-Regionen von 13 *Botryococcus braunii* Stämmen mit bekannter und unbekannter Race-Zuordnung sequenziert und mit den ITS2-Sequenzen von 51 *Botryococcus braunii* Stämmen aus der NCBI Datenbank verglichen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hegedűs et al. 2016 konnten anhand der primären- und der sekundären Struktur der ITS2-Sequenz zwei distinktive Clades (A und BL) für die untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme ermittelt werden. Die Ausprägung der beiden Clades A und BL innerhalb des Monophylums *Botryococcus braunii* lässt sich ebenfalls durch die ermittelten phylogenetischen Distanzen der Primärstruktur der ITS2-Region bestätigen. Dabei konnten alle Stämme mit bekannter Struktur der gebildeten Kohlenwasserstoffe der Race A, dem Clade A sowie alle Stämme mit der Zuordnung zu den chemischen Races B und L, dem Clade BL zugeordnet werden. Die phylogenetische Zuordnung der Stämme der Races A zu einem Clade sowie der Stämme der Races B und L zu einem weiteren, sich abgrenzenden Clade, findet sich ebenfalls bei der Analyse der 18S rRNA durch Hirano et al. 2019 wieder und lässt vermuten, dass diese phylogenetische Aufteilung der Stämme auf die unterschiedlichen Stoffwechselwege, welche zur Synthese der durch die jeweilige Race produzierten Kohlenwasserstoffe zurückzuführen ist. Die Kohlenwasserstoffe, welche durch die Stämme der A-Race produziert werden, resultieren aus der Fettsäuresynthese, wohingegen die Kohlenwasserstoffe der Races B und L über den Terpenstoffwechsel, ausgehend vom MEP-Stoffwechselweg, synthetisiert werden (Metzger and Largeau 2005; Molnár et al. 2012).

Verfolgt man die Hypothese weiter, dass sich die Unterschiede bezüglich des Stoffwechselweges bei den Races der Stämme in Clade A und BL auf die phylogenetische Einordnung übertragen lassen oder *vice versa*, würde sich erklären, warum sich die Stämme des Clade BL in die Subclades B und L aufteilen. Die *Botryococcus braunii* Sequenzen mit bekannter Zuordnung zur chemischen Race B konnten in dieser Arbeit sowie in den Untersuchungen von Hegedűs et al. 2016, als auch bei der Analyse der 18S rRNA durch Hirano et al. 2019 dem Clade B und die Sequenzen der Stämme mit bekannter Zuordnung zur Race L dem Clade L zugeordnet werden. Die Precursor-Bildung für die Synthese der Kohlenwasserstoffe der Races B und L erfolgt dabei zunächst identisch über den MEP-

Stoffwechselweg bis zum Farnesylpyrophosphat (Molnár et al. 2012). Bei den Stämmen der Race B werden dann über die Enzyme SSL-1 und SSL-3 schlussendlich die für diese Race charakteristischen Botryococcene gebildet (Molnár et al. 2012). Für die Stämme der Race L werden ausgehend von Farnesylpyrophosphat zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat über das Enzym LOS (Lycopadiensynthase) zu Lycopadien gebildet (Thapa et al. 2016). Da sich beide Races B und L im Gegensatz zu den Stämmen der Race A zunächst einen Stoffwechselweg zur Synthese der Kohlenwasserstoffe teilen, könnte damit die Aufteilung von *Botryococcus braunii* in die Hauptclades A und B/L sowie die Ausbildung der Subclades B und L erklären.

Über die Analyse der 18S rRNA konnten Hirano et al. 2019 eine Aufteilung der Clades B und L in je zwei Subclades B1 und B2 für Clade B sowie L und S für den Clade L, jedoch keine weitere Aufteilung des Clades A ermitteln. Mit Hilfe der Analyse der ITS2-Region konnte in den Untersuchungen von Hegedűs et al. 2016 als auch in dieser Arbeit eine Aufteilung des Clades A in zwei Subclades A1 und A2 sowie die Aufteilung der Clades B und L in ebenfalls zwei Subclades B1, B2, L1 und L2 ermittelt werden. Die Ausbildung der Subclades A1, A2, B1, B2, L1 und L2 lässt sich dabei nicht mehr anhand der chemischen Struktur, der durch die jeweiligen Stämme synthetisierten Kohlenwasserstoffe erklären.

Die Analyse der Sekundärstruktur der ITS2-Region bietet diesbezüglich die Möglichkeit, phylogenetische Unterschiede aufgrund von auftretenden CBCs und hCBCs zu charakterisieren. Nach Coleman 2009 kann das Auftreten von hCBCs in Helix III der ITS2-Sequenz bereits dafür sorgen, dass eine Kreuzung von Organismen sehr unwahrscheinlich wird und sich zwei verschiedene Spezies ausbilden. Wie durch Hegedűs et al. 2016 für *Botryococcus braunii* und durch Darienko et al. 2015 für *Coccomyxa* postuliert, kann über das Vorhandensein von hCBCs im Verhältnis zu CBCs ebenfalls eine Unterscheidung in verschiedene Clades stattfinden.

Betrachtet man die Sekundärstruktur der untersuchten *Botryococcus braunii* Sequenzen, konnte bezüglich der auftretenden CBCs und hCBCs durch Hegedűs et al. 2016 nur eine CBC zwischen den Stämmen des Clade A1 und A2 festgestellt werden, welche in Helix IV auftrat und nicht mit der Aufteilung der A-Race Stämme in zwei Subclades korreliert werden konnte. Die in dieser Arbeit durchgeführte CBC-Analyse zwischen den Stämmen des Clade A1 und A2 ergab keine auftretenden CBCs, was den Ergebnissen von (Hegedűs et al. 2016) mit einer auftretenden CBC entgegensteht und keine Abgrenzung der beiden Subclades anhand auftretender CBCs zulässt. Die Ursache für die Abweichung der Ergebnisse zu Hegedűs et al. 2016 kann dabei auf zwei Möglichkeiten zurückzuführen sein. Zum einen wurden im Rahmen dieser Arbeit wesentlich mehr Sequenzen bezüglich der Primär- und Sekundärstruktur der

ITS2 Region miteinander verglichen, was sich auf die CBC-Analyse auswirkt. Zum anderen wurde die Sekundärstruktur durch eine Modellierung über die ITS2 Database ermittelt. Dies geschieht anhand von Referenzsequenzen, wobei aus der Veröffentlichung nicht klar wird, welche und wie viele Sequenzen durch Hegedűs et al. 2016 verwendet und zur Ermittlung der Sekundärstruktur ermittelt wurden. Dieser Sachverhalt für die Ermittlung der Sekundärstruktur der untersuchten ITS2-Sequenzen gilt dabei für alle in dieser und der Arbeit von Hegedűs et al. 2016 untersuchten Stämme. Betrachtet man die auftretenden hCBCs zwischen den Subclades A1 und A2, konnten in dieser Arbeit bei den untersuchten Stämmen der Race A mindestens zwei und maximal fünf hCBCs, welche in Helix III auftreten, ermittelt werden.

Genau wie bei der Aufspaltung des Clade A, konnte in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hegedűs et al. 2016 eine Aufteilung des Clade B/L in die Subclades B und L mit wiederum jeweils zwei Subclades B1, B2, L1 und L2 ermittelt werden. Betrachtet man die Sekundärstruktur der Subclades B1 und B2, dann unterscheiden sich die Stämme innerhalb dieser Clades an bis zu fünf CBCs für B1 und bis zu drei CBCs für B2. Untereinander grenzen sich diese beiden Clades durch bis zu drei CBCs voneinander ab, wovon je eine CBC in Helix II und eine in Helix III lokalisiert wurde. Bei den Stämmen des Clade L1 konnten maximal zwei CBCs und bei denen des Clade L2 keine CBC festgestellt werden. Unter Einbezug der hCBCs grenzen sich die Stämme der Clades B und L deutlich von denen der Race A ab, worin sich auch die verschiedenen Stoffwechselwege begründen könnten. Die deutlich größere Anzahl an auftretenden CBCs und hCBCs bei den Stämmen der B- und L-Race konnte auch durch Hegedűs et al. 2016 ermittelt werden.

Die klimatischen Bedingungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Verbreitung bestimmter Arten und Spezies in bestimmten Regionen und Habitaten (Foflonker et al. 2018). Die Mikroalge *Botryococcus braunii* kommt global gesehen sehr weit verbreitet vor und wurde aus verschiedensten Frischwasserreservoirs, Seen und Brackwasser isoliert, welche sich von gemäßigten- über subtropische- zu tropischen Klimabereichen ausdehnen (Hirano et al. 2019; Metzger and Largeau 2005). In Anlehnung an die Untersuchungen von Hirano et al. 2019, welche versucht haben, die Klimazone des Isolationsortes (kalt-gemäßigt, warm gemäßigt, Subtropen und Tropen) der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme mit der chemischen Race, als auch mit der phylogenetischen Eingruppierung über die Analyse der 18S rRNA zu korrelieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit speziell die vorherrschenden Temperaturen am Isolationsort der untersuchten Stämme in Verbindung mit der phylogenetischen Eingruppierung anhand der ITS2-Region betrachtet.

Vergleicht man die Zuordnung der Jahresdurchschnittstemperatur bezüglich der sich ergebenden Clades der ITS2-Sequenzanalyse, konnte im Vergleich zum Clade BL (18,4 °C)

für die Stämme des Clade A (9,8 °C) eine wesentlich niedrigere durchschnittliche Jahrestemperatur am Isolationsort ermittelt werden. Dabei konnte für keinen Stamm des Clade A eine höhere Jahresdurchschnittstemperatur als 12,7 °C festgestellt werden. Das lässt die Vermutung zu, dass die Stämme, welche dem Clade A und damit der chemischen Race A zugeordnet werden können, vornehmlich in kalten und gemäßigten Klimaten auftreten, wohingegen die Stämme des Clades BL in warmgemäßigten, subtropischen und tropischen Klimazonen vorkommen.

Der Unterschied zwischen dem Vorkommen in den jeweiligen klimatischen Bereichen der Stämme des Clade A und BL könnte dabei auf das Temperaturoptimum der beteiligten Enzyme der spezifischen Stoffwechselwege zur Synthese der Kohlewasserstoffe zurückzuführen sein. Dieses konnte für das Enzym DXS des MEP-Synthesewegs, welches die Grundbausteine IPP und DMAPP der Isoprenoid-Biosynthese in den Stämmen der Race B und L (Clade BL) transponiert (Metzger and Largeau 2005) wurde durch Matsushima et al. 2012 bei 32 °C bis 34 °C ermittelt und liegt damit nahe der Jahreshöchsttemperatur der Isolationsorte der Stämme welche diesen Clades zugeordnet werden konnten und würde begründen, warum die Stämme der Races B und L vornehmlich in klimatischen Bereichen mit hohen Jahreshöchsttemperaturen vorkommen. Die weitere Aufteilung der Hauptclades A, B und L in jeweils zwei Subclades kann anhand der klimatischen Bedingungen am Isolationsort nicht getroffen werden, da anhand des untersuchten Datensatzes innerhalb dieser Subclades keine charakteristische Ausprägung der klimatischen Bereiche erkennbar ist.

Zusammenfassend kann die Zuordnung zur chemischen Race anhand der Primärstruktur der ITS2-Sequenzen abgeleitet und damit für die Identifizierung neuer potenzieller Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion genutzt werden, ohne aufwendige Analysen des Kohlenwasserstoffspektrums oder Kultivierungsversuche durchzuführen. Darüber hinaus kann unter der Betrachtung der phylogenetischen Einordnung anhand der Primär- und Sekundärstruktur der ITS2-Region (Clades A und BL), des Stoffwechselweges der synthetisierten Kohlenwasserstoffe (Race A und Races B, L), als auch über die klimatischen Gegebenheiten am Isolationsort der untersuchten Stämme eine eindeutige Abgrenzung der *Botryococcus braunii* Stämme der Races A, B und L vorgenommen werden. Eine Begründung für die Abgrenzung in die weiteren Subclades lässt sich durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht vornehmen. Für eine weitere Aufklärung der phylogenetischen Abgrenzung bedarf es der Analyse der exakten chemischen Struktur der gebildeten Kohlenwasserstoffe sowie der zugrundeliegenden Stoffwechselwege und Enzymaktivitäten bei den jeweiligen Races.

5.2 Auswahl geeigneter *Botryococcus*-Stämme zur *in situ*-Extraktion

Das Wachstum der Grünalge *Botryococcus braunii* ist im Wesentlichen durch die charakteristische Verwertung des aufgenommenen Kohlenstoffes während der Photosynthese beeinflusst. Verglichen mit anderen Pflanzen und Mikroalgen, welche ca. 85 % des aufgenommenen Kohlenstoffes für den Aufbau der Biomasse nutzen, wird durch *Botryococcus braunii* nur ca. 45 % des assimilierten Kohlenstoffes zur Biomassebildung genutzt (Melis 2013). Im Vergleich mit anderen Mikroalgen, welche ebenfalls in BG11-Medium kultiviert wurden, konnte für den Stamm Showa, für welchen die höchste Biomasseproduktivität im Rahmen des Screenings (Abschnitt 4.2) erzielt wurde ($0{,}146 \pm 0{,}008\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$), eine deutlich niedrigere Biomasseproduktivität detektiert werden (Shu et al. 2018). Dies legt eine Verwertung des assimilierten Kohlenstoffs nach Melis 2013 nahe. Die im Rahmen des Screenings erzielten Biomasseproduktivtäten zwischen $0{,}042 \pm 0{,}027\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für CCALA 779 und $0{,}146 \pm 0{,}008\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ für den Stamm Showa liegen im Bereich der in anderen Arbeiten publizierten Biomasseproduktivität (Tabelle 5-1) und unterstreicht, dass die höchste Biomasseproduktivität mit dem Stamm Showa erzielt werden kann.

Im Vergleich zu anderen Mikroalgen kann für *Botryococcus braunii* eine eher geringe Biomasseproduktivität festgestellt werden, wohingegen der Gesamtlipidgehalt mit bis zu 80 % der Biomasse deutlich über dem anderer Mikroalgen liegt. Wie am Beispiel von *Chlorella* oder *Scenedesmus* zu sehen ist, erreichen diese einen maximalen Gesamtlipidgehalt von 43 % unter ähnlichen Bedingungen (Arif et al. 2020). Die durch diese Algen gebildeten Lipide liegen dabei hauptsächlich in Form von Triacylglycerolen vor und werden unter dem Einfluss von Stress (unter anderem durch limitierte Stickstoffverfügbarkeit) gebildet. Dem gegenüber liegt der Großteil der gebildeten Lipide bei *Botryococcus braunii* als langkettige extrazelluläre Kohlenwasserstoffe vor, welche überwiegend wachstumsassoziiert gebildet werden (Griehl et al. 2015; Kojima and Zhang 1999). Diese extrazellulär vorliegenden Lipide bei *Botryococcus braunii* bieten damit einen erheblichen Vorteil bezüglich der Aufarbeitung. Die Lipidproduktivität der im Screening untersuchten *Botryococcus*-Stämme lag zwischen $0{,}026 \pm 0{,}010$ und $0{,}116 \pm 0{,}001\ g_{Lipide}\ L^{-1}\ d^{-1}$ und liegt damit nicht wesentlich höher als die anderer Grünalgen wie beispielsweise *Chlorella sorokiniana* mit 0,032 bis $0{,}132\ g_{Lipide}\ L^{-1}\ d^{-1}$ (Aziz et al. 2020; Shu et al. 2018). Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass trotz des hohen Gesamtlipidgehaltes bei *Botryococcus braunii* im Vergleich zu anderen Mikroalgen keine höhere Lipidproduktivität erzielt wird. Aus diesem Grund stellt sich der herkömmliche Produktionsprozess (Abbildung 1-1) für die Gewinnung von langkettigen Kohlenwasserstoffen aus *Botryococcus braunii* als ungeeignet dar.

Tabelle 5-1: Volumetrische Biomasse- und Kohlenwasserstoffproduktivität ausgewählter *Botryococcus*-Stämme im Vergleich zu den Ergebnissen des Screenings.

Stamm	P_X [g L^{-1} d^{-1}]	P_{KW} [g L^{-1} d^{-1}]	Reaktor	Volumen [L]	Referenz
CCAP 807/2	0,055	0,030	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,040	N/A	Carboy	8,00	Zhang 2013
	0,070	0,009	Kulturkolben	0,25	Gouveia et al. 2017
	0,104	0,040	Carboy	2,50	Blifernez-Klassen et al. 2018
	0,118	0,032	Kulturkolben	N/A	Chaudhari 2018
SAG 807-1	0,076	0,015	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,310	0,265	Blasensäule	1,00	Casadevall et al. 1985
	0,443	0,237	Flat Panel	1,00	Cheng et al. 2017
ACOI 1257	0,076	0,019	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,020	0,007	Blasensäule	2,00	Joao et al. 2017
UTEX 2441	0,092	0,015	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,060	0,008	Kulturkolben	0,50	Eroglu et al. 2011
ACOI 58	0,044	0,029	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,015	0,003	Blasensäule	2,00	Joao et al. 2017
SCCAP 1489	0,064	0,011	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,110	0,008	Kulturkolben	0,25	Gouveia et al. 2017
SAG 30.81	0,090	0,014	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,090	N/A	Kulturkolben	0,25	Gouveia et al. 2017
	0,055	0,010	Kulturkolben	0,10	Ranga Rao et al. 2007
	0,207	0,068	BioFlow	8,00	Jin et al. 2016
UTEX 572	0,067	0,011	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,079	0,013	Pond	50,00	Jin et al. 2016
	0,110	0,010	Kulturkolben	0,50	Eroglu et al. 2011
	0,110	N/A	Kulturkolben	0,25	Gouveia et al. 2017
SCCAP 1761	0,047	0,011	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
Showa	0,146	0,072	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,140	0,035	Blasensäule	0,40	Gouveia et al. 2017
	0,125	0,036	Kulturkolben	0,50	Eroglu et al. 2011
Bot22	0,132	0,068	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,080	0,046	Carboy	10,00	Mehta et al. 2019
CCALA 779	0,042	0,007	Blasensäule	1,50	diese Arbeit
	0,080	0,008	Kulturkolben	0,25	Gouveia et al. 2017

Der Gehalt an Kohlenwasserstoffen für die im Screening untersuchten Stämme lag zwischen 15,3 ± 0,1 und 51,6 ± 1,9 % der Biotrockenmasse, was in einer Kohlenwasserstoffproduktivität zwischen 5 ± 1 und 72 ± 1 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} resultiert. Diese hohe Variation des Kohlenwasserstoffgehaltes zwischen 7 und 60 % der Biotrockenmasse für unterschiedliche Stämme von *Botryococcus braunii* wurde ebenfalls in anderen Studien publiziert (Eroglu et al. 2011; Gouveia et al. 2017; Li et al. 2013). Für die beiden B-Race Stämme Showa und Bot22 konnte ein durchschnittlicher Kohlenwasserstoffgehalt von 50 % der Biotrockenmasse

ermittelt werden, wohingegen für die Stämme der A-Race ein durchschnittlicher Kohlenwasserstoffgehalt von 25 % detektiert wurde. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in der Kohlenwasserstoffproduktivität wider. Für die Stämme der A-Race lag die durchschnittliche Kohlenwasserstoffproduktivität mit $15 \pm 6\ mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$ signifikant unter der Kohlenwasserstoffproduktivität der B-Race Stämme mit durchschnittlich $70 \pm 2\ mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$ (ANOVA, $F_{1,9} = 160{,}341$, $p < 0{,}001$). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Li et al. 2013 und Gouveia et al. 2017 erzielt. Bei dem Vergleich der Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Screenings und der Ergebnisse anderer Wissenschaftler wird deutlich, dass die Stämme der B-Race deutlich mehr Kohlenwasserstoffe akkumulieren als die Stämme der A-Race.

Die Kosten für die Nährstoffversorgung der Mikroalgen während der Kultivierung liegen zwischen 3 und 10 % der Gesamtkosten und spielen neben den Kosten für die Aufarbeitung der Algenbiomasse eine wichtige Rolle für die Rentabilität der Gewinnung wertvoller Subtanzen aus Mikroalgen (Acién et al. 2012). Im Allgemeinen kann der Nährstoffverbrauch des Erhaltungsstoffwechsels von Mikroalgen aus der stöchiometrischen Formel der Biomassezusammensetzung nach Redfield (1958) mit $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$ ermittelt werden. Davon ausgehend werden 63 mg Stickstoff (280 mg Nitrat) und 9 mg Phosphor (28 mg Phosphat) für die Erzeugung von einem Gramm Mikroalgenbiomasse benötigt. Unter Beachtung, dass diese Formel nur eine sehr allgemeine Gleichung darstellt und für marines Phytoplankton ermittelt wurde, wird der reale Nährstoffverbrauch von Mikroalgen maßgeblich von den gegebenen Kultivierungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Licht, CO_2 und anderen Umwelteinflüssen beeinflusst. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten kann aus dem im Rahmen des Screenings ermittelten Nährstoffverbrauches ein grober Rückschluss für die Auswahl eines geeigneten *Botryococcus*-Stammes für das Verfahren der *in situ*-Extraktion gezogen werden. Im Rahmen des Screenings wurde für die untersuchten Stämme ein Verbrauch an Nitrat zwischen 190 ± 17 und $931 \pm 30\ mg_{Nitrat}\ g_X^{-1}$ ermittelt. Der durchschnittliche Nitratverbrauch aller Stämme von $497 \pm 194\ mg_{Nitrat}\ g_X^{-1}$ lag damit fast doppelt so hoch, wie der theoretisch ermittelte Wert. Gleiches gilt für den Verbrauch an Phosphat, welcher mit durchschnittlich $38{,}5 \pm 17\ mg_{Phosphat}\ g_X^{-1}$ ebenfalls 38 % über dem theoretischen Wert von $28\ mg_{Phosphat}\ g_X^{-1}$ lag. Diese große Abweichung zwischen den theoretischen und experimentell ermittelten Werten kann anhand der im Rahmen des Screenings erhaltenen Ergebnisse nicht erklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen zum Nährstoffverbrauch. Abgesehen davon konnte der niedrigste Verbrauch an Nährstoffen für den Stamm Showa ermittelt werden, was die Eignung dieses Stammes für das Verfahren der *in situ*-Extraktion und für ein Scale-up bekräftigt.

Ein weiterer kritischer Einflussfaktor für das Verfahren der *in situ*-Extraktion ist durch die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels und damit verbunden, dessen Biokompatibilität zum extrahierten Algenstamm gegeben. Diesbezüglich wurden bereits eine ganze Reihe an Lösungsmitteln (Dihexylether, Dodecan, Dodecylacetat, Heptan, Hexan, Octan, *n*-Octanol, Tetradecan) für das Milking von *Botryococcus braunii* untersucht und durch Jackson et al. (2017) zusammengefasst. Zusätzlich zur Biokompatibilität des Lösungsmittels, welche durch den Extraktionsprozess in Form der Kontaktzeit zum Lösungsmittel beeinflusst werden kann (Griehl et al. 2015), sind die Energiekosten für die Rückgewinnung des Lösungsmittels nach der Extraktion ein wichtiger Faktor für die Durchführung dieses Verfahrens in größeren Maßstäben. Der Siedepunkt des Lösungsmittels ist bei den Kosten für die Rückgewinnung der ausschlaggebende Faktor. Jackson et al. (2017) haben eine Rangliste von acht bereits untersuchten Lösungsmitteln aufgestellt und diese hinsichtlich Biokompatibilität, Siedepunkt, Extraktionseffizienz, Kosten und Sicherheit bewertet. Aus dieser Rangliste ergibt sich, dass *n*-Hexan aufgrund des niedrigen Siedepunktes, niedriger Beschaffungskosten und guter Extraktionseffizienz das Lösungsmittel mit der besten Eignung für das Milking von Kohlenwasserstoffen aus *Botryococcus braunii* darstellt. Als weiteres Lösungsmittel eignet sich *n*-Octan aufgrund der guten Biokompatibilität, ist aber mit höheren Kosten für die Beschaffung und Rückgewinnung verbunden. Eine bessere Biokompatibilität für *n*-Octan gefolgt von *n*-Heptan und *n*-Hexan wurde auch im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Screenings festgestellt. Die Biokompatibilität oder Toxizität eines Lösungsmittels wird in der Regel mit Hilfe des logarithmierten Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten ($LogP_{Oct}$) dargestellt. Dabei erhöht sich die Biokompatibilität mit steigendem $LogP_{Oct}$-Wert (Lide 2004) und erklärt die steigende Biokompatibilität von *n*-Hexan ($LogP_{Oct}$ 4,00) über n-Heptan ($LogP_{Oct}$ 4,50) zu n-Octan ($LogP_{Oct}$ 5,15) der im Rahmen des Screenings ermittelten Ergebnisse.

Unter den untersuchten Stämmen zeigten die Stämme Showa und Bot22 die beste Lösungsmittelkompatibilität und Extrahierbarkeit an Kohlenwasserstoffen. Im Falle der Extrahierbarkeit der Kohlenwasserstoffe kann das mit dem hohen Anteil an extrazellulären Kohlenwasserstoffen bei diesen beiden Stämmen im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen erklärt werden. Die gute Lösungsmittelverträglichkeit der beiden Stämme kann auf die die Zellen umgebende extrazelluläre Matrix zurückgeführt werden. Diese extrazelluläre Matrix besteht bei *Botryococcus braunii* aus flüssigen Kohlenwasserstoffen, welche extrahiert werden können und aus polymerisierten Kohlenwasserstoffen, welche nicht in das entsprechende Lösungsmittel übergehen (Metzger et al. 2008). Berkaloff et al. 1983 konnten nachweisen, dass die Zellwand des untersuchten A-Race Stammes aus einem Biopolymer bestand, welches gegenüber einem nicht-oxidativen Abbau resistent war. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass dieses Biopolymer bis zu 9 % der Biotrockenmasse ausmacht und

assoziativ zu den flüssigen Kohlenwasserstoffen gebildet wird. Zusammenfassend kann daraus die Annahme abgeleitet werden, dass mit einem erhöhten Gehalt an extrahierbaren Kohlenwasserstoffen, auch der Gehalt an polymerisierten, schützenden Kohlenwasserstoffen steigt und damit verbunden, eine höhere Lösungsmitteltoleranz bei den B-Race Stämmen im Vergleich zu den A-Race Stämmen gegeben ist.

Zusammenfassend konnte über die erstellte Rangliste unter Einbeziehung von Wachstum, Nährstoffverbrauch, Gesamtlipidgehalt, Kohlenwasserstoffkonzentration, Lösungsmittel-kompatibilität und der Extrahierbarkeit eine Eignung der jeweiligen *Botryococcus*-Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion abgeschätzt werden. Die Stämme Showa und Bot22 erwiesen sich dabei als sehr vielversprechend und sollten weiterführend untersucht werden.

5.3 Koloniebildung und Sekretion langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii*

Die *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 konnten über ein Screening zur Identifikation geeigneter Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion als geeignete Kandidaten ermittelt werden. Beide Stämme weisen einen hohen Gehalt extrazellulärer Kohlenwasserstoffe auf, welcher mit einem für diese Algenart gutem Wachstum einhergeht. Abgesehen davon, dass beide Stämme zur gleichen Algenart zählen und aufgrund der chemischen Struktur der gebildeten Kohlenwasserstoffe sowie molekularphysiologisch als Stämme der B-Race klassifiziert wurden (Kawachi et al. 2012), weisen beide Stämme bei der Zellgröße zwar morphologische Gemeinsamkeiten, bei der Ausprägung der Kolonien aber deutliche morphologische Unterschiede auf. Bezüglich der Größe der Zellen in den Kolonien des jeweiligen Stammes konnten über die durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen bei den vorherrschenden Kultivierungsbedingungen (Abschnitt 0) mit 8,11 ± 1,84 µm für den Stamm Showa und 7,77 ± 4,32 µm für den Stamm Bot22 keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. In anderen Arbeiten konnte für den Stamm Bot22 eine durchschnittliche Zellgröße von 4,73 bis 14,50 µm (Tanoi et al. 2014; Tsutsumi et al. 2018a, 2018b) ermittelt werden, was mit den Maxima (17,05 µm) und Minima (3,77 µm) der in der Arbeit ermittelten Zellgrößen einhergeht. Die Zellgröße von über 40 *Botryococcus* Stämmen, welche durch Komárek and Marvan 1992 aus verschiedensten klimatischen Bereichen isoliert wurden, lag stammübergreifend zwischen 4,4 und 20 µm und lässt keine Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen klimatischem Bereich und Zellgröße zu, da in jedem klimatischen Bereich unterschiedliche Zellgrößen gefunden wurden (Komárek and Marvan 1992).

Während sich die Zellgrößen der beiden untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 nicht wesentlich unterscheiden, konnte für die Morphologie, als auch für die Größenverteilung der durch den jeweiligen Stamm gebildeten Kolonien erhebliche Unterschiede festgestellt werden. Wie bezüglich der Größenverteilung der beiden Stämme in Abbildung 4-9 ersichtlich wird, sind die Kolonien des Stammes Bot22 mit einem durchschnittlichen Koloniedurchmesser von 236,58 ± 84,21 µm ca. 3-mal so groß wie die Kolonien des Stammes Showa mit 75,07 ± 22,35 µm. Die Größe der durch den jeweiligen Stamm gebildeten Kolonien scheint dabei maßgeblich von den Kultivierungsbedingungen wie dem Lichteintrag, der CO_2-Konzentration und mechanischer Beanspruchung abhängig zu sein (Ge et al. 2011; Hoeniges et al. 2020; Khatri et al. 2014; Zhang and Kojima 1998). Für den Stamm Showa konnte eine vom zur Verfügung stehenden Licht abhängige Koloniegröße zwischen 90 und 340 µm festgestellt werden, wobei kleinere Kolonien bei niedrigerer und größere Kolonien bei höherer Lichtintensität festgestellt wurden (Khatri et al. 2014). Die Ausprägung unterschiedlicher Koloniegrößen je nach zur Verfügung stehendem Licht wird

durch Khatri et al. 2014 mit dem Schutz der Kolonien vor zu hoher Lichtintensität in Verbindung gebracht, wonach sich bei viel Licht größere Kolonien ausprägen um eine erhöhte Selbstbeschattung der einzelnen Zellen zu gewährleisten. Eine ähnliche Beobachtung konnte durch Ge et al. 2011 bei dem Stamm 765 (Chinese Academy of Science) auch in Bezug auf die zur Verfügung gestellte CO_2-Konzentration und durch Furuhashi et al. 2016a bei dem Stamm Showa in Bezug auf die Salzkonzentration beobachten werden. Mit steigender CO_2-Konzentration von 2 über 5 auf 10 % CO_2 wurde eine Zunahme der Koloniegröße von 10 bis 20 µm über 20 bis 30 µm auf 30 bis 40 µm festgestellt (Ge et al. 2011), was auch bei steigender Salinität zutrifft. Hier wurde eine Zunahme der Koloniegröße von ca. 60 µm auf über 200 µm bei einer Salinität von 0,3 % beobachtet (Furuhashi et al. 2016a). Diese Licht-, CO_2-, und Salinität-abhängige Ausprägung der Koloniegröße legt nahe, dass über die Regulierung der Koloniegröße durch *Botryococcus braunii* eine Beeinflussung der vorherrschenden Umwelteinflüsse stattfindet. Zum einen können durch größere Kolonien schädliche Umwelteinflüsse, wie eine zu hohe Lichtintensität oder eine zu hohe Konzentration an CO_2 beziehungsweise Nährstoffen besser kompensiert und zum anderen können bei kleinen Kolonien die zum Wachstum benötigten Ressourcen für jede einzelne Zelle besser zugänglich gemacht werden. Ein weiterer Mechanismus zur Regulierung der Umwelteinflüsse kann unabhängig von der stammspezifischen Ausprägung der Kolonien auch in der Kompaktheit der Kolonien (Dichte bzw. Anzahl der Zellen) gesehen werden. Je kompakter und enger die Zellen in der Kolonie zusammenliegen, desto besser sollten diese vor schädlichen Umwelteinflüssen geschützt sein. Wie aus den mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4-8 deutlich wird, sind die Kolonien des Stammes Showa im Vergleich zu denen des Stammes Bot22 wesentlich kompakter ausgeprägt. Vergleicht man die Ausprägung der Kolonie mit der in Abschnitt 4.2.3 ermittelten Lösungsmittelverträglichkeit, lässt sich im Vergleich zu dem Stamm Bot22 mit größeren Zwischenräumen in der Kolonie für den Stamm Showa mit kompakteren Kolonien eine geringfügig bessere Lösungsmittelverträglichkeit feststellen. Eine ähnliche Beobachtung resultierte während Versuchen, bei denen die die Zellen umgebenden Schichten aus polymerisierten Kohlenwasserstoffen bei dem Stamm Showa durch eine Hitzebehandlung entfernt wurden (Furuhashi et al. 2016b). Die Entfernung der schützenden polymerisierten Kohlenwasserstoffe resultierte in größeren Zwischenräumen zwischen den Zellen, was zu einer besseren Zugänglichkeit des Lösungsmittels und damit verbunden, zu einer besseren Extrahierbarkeit der flüssigen Kohlenwasserstoffe führte (Furuhashi et al. 2016b). Für den Stamm Bot22 konnte durch Tanoi et al. 2014 festgestellt werden, dass sich die Zelldichte in den Kolonien verringert, wenn diese von einem Medium mit hoher Eisenkonzentration in ein Medium mit niedriger Eisenkonzentration überführt werden. Diese Untersuchungen zeigen auf, dass nicht nur die Koloniegröße, sondern auch die Koloniedichte

maßgeblich durch die Umweltbedingungen beeinflusst wird. Mit Hinblick auf die Anwendung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion kann bezogen auf die Verträglichkeit des Lösungsmittels und die Extrahierbarkeit der Kohlenwasserstoffe ein maßgeblicher Einfluss durch die Koloniegröße und -dichte erwartet werden.

Die Koloniebildung des Stammes Bot22 (Abschnitt 2.3.5) scheint im Wesentlichen mit den durch Suzuki et al. 2013 in Abschnitt 2.3.5 postulierten Mechanismen des Stammes Showa übereinzustimmen. Wie bei Showa werden auch die Kolonien des Stammes Bot22 durch die Kohlenwasserstoffschichten, welche nach der Zellteilung zurückbleiben, am basalen Bereich der Zellen und der Tochterzellen in der Kolonie zusammengehalten und mit steigender Koloniegröße mit Ausrichtung des apikalen Zellbereichs zum Kolonieäußeren arrangiert. Nach Erreichen einer kritischen Koloniegröße, welche wie vorher beschrieben maßgeblich durch äußere Umweltbedingungen beeinflusst wird, zerfallen die Kolonien dann in einzelne Tochterkolonien (Suzuki et al. 2013; Weiss et al. 2012). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten Tanoi et al. 2014 aufklären, dass das Zusammenhalten der einzelnen Zellen und Tochterzellkomplexe in den Kolonien nicht nur über die Kohlenwasserstoffschichten, sondern auch durch die Zellform bestimmt wird. In Kulturen, in denen ein Eisenmangel vorherrschte, konnte eine Verformung der einzelnen Zellen von der typischen Birnenform hin zu einer mehr konischen Form beobachtet werden. Diese Verformung der Zellen erschwert dabei das Halten der Zellen in der Ummantelung der Mutterzellen am basalen Bereich und sorgt damit für ein Herauslösen von einzelnen Zellen oder Tochterzellverbünden, was in lose arrangierten Kolonien und einem reduzierten Koloniedurchmesser resultiert (Tanoi et al. 2014). Damit verbunden kann die mikroskopische Analyse der Koloniebeschaffenheit, als auch die Analyse des Koloniedurchmessers einen Einblick in den physiologischen Zustand der Kultur geben und zur Beurteilung des Einflusses äußerer Parameter, wie beispielswiese die Behandlung mit Lösungsmitteln, während der *in situ*-Extraktion genutzt werden.

Bezüglich der Sekretion der Kohlenwasserstoffe durch den Stamm Bot22 ergeben sich ebenfalls Gemeinsamkeiten mit den Sekretionsmechanismen des Stammes Showa. Wie in Abbildung 4-11 dargestellt und adäquat zu Showa (Suzuki et al. 2013), konnten bei dem Bot22 über den kompletten Zellzyklus Lipidkörper festgestellt werden, welche kurz vor der Zellteilung und Ausprägung des Septums zwischen den Zellen ein Maximum erreichen. Damit unterscheidet sich die Kohlenwasserstoffakkumulation in den Lipidkörpern der B-Race Stämme Showa (Suzuki et al. 2013) und Bot22 von den Stämmen der A-Race, bei denen mit Kohlenwasserstoffen gefüllte Lipidkörper nur während der Wachstumsphase auftreten (Hirose et al. 2013). Nach der Ausbildung der beiden Tochterzellen (Abbildung 4-11 4A und 4B) kann eine Ansammlung flüssiger Kohlenwasserstoffe am lateralen Bereich zwischen den

Tochterzellen und am basalen Bereich der Tochterzellen beobachtet werden und wie bei dem Showa (Suzuki et al. 2013) als hauptsächlicher Zeitpunkt der Sekretion der Kohlenwasserstoffe gesehen werden. Der Zeitpunkt, als auch die mit dem Zellzyklus assoziierte Sekretion der Kohlenwasserstoffe spielt mit Hinblick auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion somit eine entscheidende Rolle. Um eine gleichbleibende Ausbeute an Kohlenwasserstoffen über einen längeren Zeitraum zu realisieren, ist es daher notwendig, die Teilung der *Botryococcus braunii* Zellen aufrechtzuerhalten. Bestrebungen zur Optimierung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* Showa und Bot22 müssen zum einen eine Steigerung der Zellteilung anstreben, weil damit eine Steigerung der Sekretion an Kohlenwasserstoffen einhergeht und zum anderen eine Inhibierung der Zellteilung durch das Lösungsmittel bestmöglich verhindern.

5.4 Optimierung der Einflussgrößen für die *in situ*-Extraktion der *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22

Neben den biotischen Einflussfaktoren wie Wachstum, Kohlenwasserstoffgehalt und Lösungsmittelkompatibilität der untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme wird die Extraktionseffizienz der *in situ*-Extraktion aus verfahrenstechnischer Sicht im Wesentlichen durch die effektive Extraktionszeit, also die Zeit, die jeder Partikel mit dem Lösungsmittel in Kontakt steht und durch die Phasengrenzfläche, also die Fläche, die für einen Stoffaustausch zwischen Kultursuspension und Lösungsmittel zur Verfügung steht, beeinflusst (Schlüter 2018). Bei dem in dieser Arbeit genutzten *in situ*-Extraktionsverfahren nach Griehl et al. 2015 wird die Kultursuspension aus dem Kultivierungssystem über eine Pumpe in eine mit Lösungsmittel befüllte Extraktionssäule überführt und mit Hilfe eines Dispergierers in Form einer Düse im Lösungsmittel verteilt. Abhängig vom angelegten Volumenstrom, den Lösungsmitteleigenschaften und dem Durchmesser der Düse werden zeitabhängig eine bestimmte Anzahl an Kultursuspensionspartikeln mit einem charakteristischen Durchmesser und Oberfläche (Phasengrenzfläche) durch periodische Tropfenbildung oder durch Strahlenzerfall im Extraktionsmittel erzeugt (Schlüter 2018). Diese Kultursuspensionspartikel durchqueren dann in Abhängigkeit der Größe und der Lösungsmittelhöhe in einer bestimmten Zeit das Lösungsmittel (effektive Extraktionszeit), sammeln sich am Boden der Extraktionssäule und gelangen über Schwerkraft zurück ins Kultivierungssystem (Abbildung 3-2). Neben der Extraktionseffizienz, welche durch die vorher beschriebenen Parameter beeinflusst wird, spielt der physiologische Zustand der extrahierten Kultur eine entscheidende Rolle, um eine möglichst lange Durchführung der *in situ*-Extraktion unter Aufrechterhaltung der Produktion an Kohlenwasserstoffen bei *Botryococcus braunii* zu erzielen. Da das Lösungsmittel mit zunehmender Kontaktzeit zur Kultursuspension über das Eindringen in die Kolonien oder die Zellen einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität und, damit verbunden, eine Reduzierung der Zellteilung und Verringerung der Sekretion an Kohlenwasserstoffen nach sich zieht, muss bei der Durchführung der in situ-Extraktion ein Kompromiss zwischen Extraktionseffizienz und Kulturvitalität eingegangen werden (Griehl et al. 2015). Aufgrund dessen, dass zum aktuellen Zeitpunkt nur sehr wenige Stämme der Mikroalge *Botryococcus braunii* dem Verfahren der *in situ*-Extraktion unterzogen wurden (Tabelle 2-4) und die verfahrenstechnische Ausführung der *in situ*-Extraktionen der in Tabelle 2-4 aufgeführten Arbeiten einer starken Variation unterliegt (Griehl et al. 2015; Jackson et al. 2017, 2020), konnten von Seiten der Literatur keine optimalen Extraktionsparameter für die in dieser Arbeit als potentielle Kandidaten zur *in situ*-Extraktion identifizierten *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 abgeleitet werden.

5.4.1 Ermittlung der optimalen Extraktionszeit

Aus den vorher diskutierten Gründen wurde für die Ermittlung der stammspezifischen optimalen Extraktionszeit der beiden Stämme Showa und Bot22 wie in Abschnitt 4.4 beschrieben ein einheitliches, stammübergreifendes Setup der *in situ*-Extraktion gewählt, mit welchem unter Beachtung des Zellwachstums als Indikator der Zellvitalität durch schrittweise Steigerung der Extraktionszeit die optimale effektive Extraktionszeit und Phasengrenzfläche für den jeweiligen Stamm ermittelt werden konnte. Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen über 7 Tage *in situ*-Extraktion hervorgeht, liegt die optimale Extraktionszeit, bei der das Wachstum der Kultur gerade noch die schädlichen Effekte des Lösungsmittelkontaktes kompensiert, bei den Kulturen mit einer Startbiomassekonzentration von 1,5 $g_X\ L^{-1}$, als auch bei den Kulturen mit einer Startbiomassekonzentration von 2,5 $g_X\ L^{-1}$, für den Stamm Showa bei ca. 300 min d^{-1} und bei dem Stamm Bot22 bei ca. 200 min d^{-1}. Diese Extraktionszeiten entsprechen dabei einer Extraktionszahl von 464 $\mathrm{m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ für den Stamm Showa und 206 $\mathrm{m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ für den Stamm Bot22. Die effektive Extraktionszeit, über die die Kultursuspension pro Tag mit dem Lösungsmittel in Kontakt stand, entspricht 12,91 s bei 300 min und 8,61 s bei 200 min täglicher Extraktionszeit. Während für den Stamm Bot22 in dieser Arbeit bereits ein negativer Einfluss auf die Zellvitalität bei einer effektiven Extraktionszeit > 8,61 s d^{-1} festgestellt werden konnte, beobachteten Mehta et al. 2019 keinen negativen Effekt auf die Zellvitalität bei täglichen effektiven Extraktionszeiten von 84 und 276 s d^{-1}. Der gravierende Unterschied kann dabei zum einen auf das eingesetzte Lösungsmittel zurückgeführt werden, bei dem sich die Biokompatibilität des Lösungsmittels mit steigendem $\log P_{Oct}$-Wert erhöht (Frenz et al. 1989). Mehta et al. 2019 nutzten für die Extraktionsversuche *n*-Dodecan, welches einen $\log P_{Oct}$-Wert von 6,10 aufweist, wohingegen in dieser Arbeit *n*-Hexan mit einem $\log P_{Oct}$-Wert von 4,00 genutzt wurde. Ein weiterer Grund für die durch Mehta et al. 2019 detektierte höhere Lösungsmittelkompatibilität des Stammes Bot22 lässt sich durch Betrachtung der zur Verfügung gestellten Phasengrenzfläche relativieren. Bei einer effektiven Extraktionszeit von 276 s^{-1} wurde in den Versuchen von Mehta et al. 2019 eine Phasengrenzfläche von 0,0204 m^2 generiert, wohingegen bei den Versuchen in dieser Arbeit bei einer effektiven Extraktionszeit von 8,61 s eine Phasengrenzfläche von 23,985 m^2 erzeugt wurde. Bildet man daraus die eingangs beschriebene Extraktionszahl, dann liegt diese bei den Versuchen von Mehta et al. 2019 mit 5,63 $\mathrm{m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$ deutlich unter der in dieser Arbeit ermittelten Extraktionskennzahl von 206 $\mathrm{m^2\ s\ L_{Susp}^{-1}}$, begründet damit die bessere Biokompatibilität und verdeutlicht die Wichtigkeit der zusammenhängenden Betrachtung beider extraktionsrelevanter Faktoren (effektive Extraktionszeit und Phasengrenzfläche). Vergleicht man die untersuchten Stämme Showa und

Bot22, dann lässt sich feststellen, dass die optimale Extraktionszeit für den Stamm Bot22 mit 200 min deutlich unter der des Stammes Showa mit 300 min liegt, was sich auch in einer niedrigeren optimalen effektiven Extraktionszeit und damit verbunden in einer niedrigeren optimalen Extraktionszahl widerspiegelt. Bei der Untersuchung von zwei A-Race Stämmen (SAG 807-1 und CCAP 807/2) sowie eines B-Race Stammes (SCCAP K-1761) konnten Griehl et al. 2015 feststellen, dass für den Stamm SAG 807-1 bis zu einer effektiven Extraktionszeit von 36 s d^{-1} keine negative Beeinflussung der Zellvitalität stattfindet, wohingegen für den Stamm CCAP 807/2 und SCCAP K-1761 bereits bei 12 s d^{-1} eine Reduzierung der Biomassekonzentration beobachtet wurde. Anhand der wenigen veröffentlichten Daten auf diesem Gebiet lässt sich bezüglich der optimalen Extraktionszeit keine definierte Schlussfolgerung ziehen. Nichtsdestotrotz kann davon ausgegangenen werden, dass wie im vorherigen Kapitel diskutiert (Abschnitt 5.3), die stammspezifischen morphologischen Eigenschaften einen erheblichen Einfluss auf die Lösungsmittelkompatibilität ausüben. Die Kolonien des Stammes Showa sind im Vergleich zu dem Stamm Bot22 wesentlich kleiner ausgeprägt und die Zellen sind in den Kolonien kompakter angeordnet. Diese kompaktere Anordnung der Zellen in den Kolonien des Stammes Showa kann dabei eine erhöhte Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen bedingen (Furuhashi et al. 2016b). Dies würde auch die unterschiedlichen optimalen Extraktionszeiten der beiden Stämme Showa und Bot22 begründen, da bei dem Stamm Showa mit kompakteren Kolonien eine längere Extraktionszeit bis zum Einsetzen einer Zellschädigung gemessen werden konnte, wohingegen bei dem Stamm Bot22 mit loseren Kolonien eine geringere Extraktionszeit bis zum Eintritt einer Schädigung festgestellt wurde. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass in den Zellzwischenräumen der Kolonien des Stammes Bot22 nach der Extraktion Lösungsmittelreste zurückbleiben können (Furuhashi et al. 2016b), was die Zellvitalität nachträglich beeinflussen kann, da *n*-Hexan die Plasmamembran der Zellen nachhaltig schädigen und somit in das Zellinnere vordringen kann (Kleinegris et al. 2011a; Moheimani et al. 2013a).

Betrachtet man die durchschnittliche Kohlenwasserstoffausbeute der beiden Stämme Showa und Bot22 bei optimaler Extraktionszeit und einer Startbiomassekonzentration von 1,5 g_X L^{-1}, lassen sich mit 16,19 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (10,63 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}) für den Stamm Showa und 16,75 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (10,48 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}) für den Stamm Bot22 keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Diese Werte spiegeln sich auch bei den Versuchen mit einer Startbiomassekonzentration von 2,5 g_X L^{-1} wider, bei denen der Steigerung der Biomasse um 66 % entsprechend auch eine um ca. 60 % gesteigerte volumetrische Kohlenwasserstoffproduktivität mit ca. 26 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} und eine mit ca. 11 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1} identische biomassespezifische Kohlenwasserstoffproduktivität detektiert werden konnte.

Basierend auf diesen Werten kann ein Einfluss der Biomassekonzentration auf die Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen, während der *in situ*-Extraktion zunächst ausgeschlossen werden und verdeutlicht, dass durch Erhöhung der Biomassekonzentration im System auch die volumetrische Ausbeute an Kohlenwasserstoffen gesteigert werden kann. Bezüglich der Ausbeute an Kohlenwasserstoffen konnte durch Mehta et al. 2019 für den Stamm Bot22 über 7 Tagen *in situ*-Extraktion unter einem ähnlichen Versuchsaufbau mit dem Lösungsmittel *n*-Dodecan eine durchschnittliche Kohlenwasserstoffproduktivität 6,4 $mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$ bzw. 3,6 $mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$ ermittelt werden. Wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben, lag die Extraktionskennzahl bei den Versuchen von (Mehta et al. 2019) jedoch deutlich unter der für den Stamm als optimal ermittelter Extraktionskennzahl in dieser Arbeit, was die niedrigere Ausbeute erklärt. Durch Moheimani et al. 2014 konnte während der *in situ*-Extraktion des Stammes Bot22 über 70 Tage bei 14 Extraktionszyklen und dem Lösungsmittel *n*-Heptan eine Kohlenwasserstoffproduktivität von 11,63 $mg_{KW}\ L^{-1}\ d^{-1}$ ermittelt werden. Allerdings ist dieser durch Moheimani et al. 2014 detektierte Wert mit der in dieser Arbeit gemessenen Produktivität nur schwer vergleichbar, da das durch Moheimani et al. 2014 angewandte Verfahren der *in situ*-Extraktion über ein Mixen von Kultursuspension und Lösungsmittel in einem Kulturkolben auf einem Orbitalschüttler nicht mit dem in dieser Arbeit genutzten Verfahren übereinstimmt. Für eine *in situ*-Extraktion des Stammes Showa existieren zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbaren Studien. Vergleicht man die Stämme Showa und Bot22 untereinander, lässt sich die fast identische Produktivität an Kohlenwasserstoffen über den Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse erklären. Für beide Stämme konnte in dieser Arbeit (Tabelle 4-5) eine nahezu identische Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen von 49,3 % (Showa) bzw. 51,6 % (Bot22) während der Versuche zur Identifizierung geeigneter Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion in Abschnitt 4.2 ermittelt werden.

Für eine bessere Aussagekraft und Beurteilung der Ergebnisse zur Ermittlung der optimalen Extraktionszeit für die *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 wurden wie in Abschnitt 4.4.2 dargestellt, *in situ*-Extraktionen unter der jeweils optimalen Extraktionszeit über 30 Tage bei einer Startbiomassekonzentration von 1,5 $g_X\ L^{-1}$ durchgeführt. Die durchschnittliche Biomasseproduktivität lag während dieser Versuche über 30 Tage für den Stamm Showa bei $0{,}005 \pm 0{,}103\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und für den Stamm Bot22 bei $0{,}001 \pm 0{,}094\ g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ und bekräftigt damit, dass vergleichend zu den Versuchen über 7 Tage bei der jeweils optimalen Extraktionszahl das Wachstum der Kultur gerade noch die schädlichen Effekte des Lösungsmittelkontaktes kompensiert. Darüber hinaus verdeutlicht die Stagnation der Biomasse bei gleichzeitiger Extraktion von langkettigen Kohlenwasserstoffen über den Versuchszeitraum von 30 Tagen die Wirkweise des Verfahrens der *in situ*-Extraktion

bei *Botryococcus braunii*, da im Vergleich zu herkömmlichen Prozessführung (Abbildung 1-1) bei diesem Verfahren keine Zunahme der Biomasse beabsichtigt ist (Griehl et al. 2015; Jackson et al. 2017).

Die durchschnittliche Produktivität an Kohlenwasserstoffen für den Stamm Showa, welche für die Experimente über 7 Tage bei 16,19 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (10,63 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}) lag, konnte mit 16,99 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (10,53 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}) auch bei der 30 Tage *in situ*-Extraktion detektiert werden. Für den Stamm Bot22 hingegen wurde mit 14,53 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} (10,48 mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}) über 30 Tage eine etwas reduzierte Kohlenwasserstoffproduktivität im Vergleich zu den Extraktionen über 7 Tage detektiert. Berücksichtigt man die durchschnittliche Konzentration an Kohlenwasserstoffen in der Biomasse über die Versuchsdauer, lässt sich der Unterschied in der Kohlenwasserstoffproduktivität der beiden Stämme erklären. Wie aus der Gegenüberstellung der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse und der täglichen Ausbeute an Kohlenwasserstoffen während der *in situ*-Extraktion (Abbildung 4-17) hervorgeht, besteht eine direkte Korrelation zwischen diesen beiden Größen. Mit 0,417 ± 0,139 g_{EKW} g_X-1 konnte für den Stamm Bot22 im Vergleich zu dem Stamm Showa mit 0,538 ± 0,098 g_{EKW} g_X^{-1} eine deutlich niedrigere durchschnittliche Konzentration an Kohlenwasserstoffen in der Biomasse festgestellt werden, was damit verbunden auch die niedrigere Ausbeute an Kohlenwasserstoffen erklärt. Die Ursachen für diese mit 42 % vergleichsweise niedrige Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse des Stammes Bot22 in diesen Versuchen können vielfältiger Natur sein. Beispielsweise wirken sich bereits die Kultivierungsbedingungen der Vorkultur dauerhaft auf das Verhalten einer Mikroalgenkultur aus (Kojima and Zhang 1999). Darüber hinaus können bereits geringe Veränderungen der Kultivierungsbedingungen, wie Nährstoffgehalt oder Licht, eine Veränderung der Koloniemorphologie bewirken (Furuhashi et al. 2016a; Tanoi et al. 2014), was wiederum Einfluss auf den Gehalt extrazellulärer Kohlenwasserstoffe hat. Zwar wurde über die gesamte Dauer der Versuche versucht, alle Kultivierungs- und Extraktionsparameter mit großer Sorgfalt so konstant wie möglich zu halten, jedoch kann aufgrund der manuellen Steuerung der meisten Parameter eine Abweichung im Laufe der Versuche zu den zum Startzeitpunkt eingestellten Parametern und damit verbunden eine Änderung der biologischen Kultureigenschaften nicht komplett ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die Produktivität an Kohlenwasserstoffen mit anderen Arbeiten, konnte für den Stamm Bot22 durch Moheimani et al. 2014 eine Kohlenwasserstoffproduktivität von 11,63 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} ermittelt werden. Im Vergleich zu Stämmen der A-Race, liegt die Kohlenwasserstoffproduktivität für die Stämme der B-Race anhand der zum aktuellen Zeitpunkt existierenden Veröffentlichungen deutlich höher. Moheimani et al. 2013a konnten bei der *in situ*-Extraktion des A-Race Stammes CCAP 807/2 über 6 Tage eine

Kohlenwasserstoffproduktivität zwischen 3 und 7 $mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$ und Griehl et al. 2015 bei der *in situ*-Extraktion des A-Race Stammes SAG 807-1 über 30 Tage eine Kohlenwasserstoffproduktivität 1,30 $mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$ ermitteln.

Die hohen Konzentrationen an extrazellulären Kohlenwasserstoffen mit bis zu 86 % der Biomasse (Borowitzka 2018b), als auch die deutlich höheren Produktivtäten während der *in situ*-Extraktion verdeutlichen das größere Potential der B-Race Stämme gegenüber den Stämmen der A-Race und bekräftigen deren Auswahl für die weitere Optimierung dieses Verfahrens. Darüber hinaus konnte durch Ermittlung der Extraktionszahl gezeigt werden, dass für eine genaue Betrachtung der *in situ*-Extraktion beide Parameter, sowohl die effektive Extraktionszeit als auch die zur Verfügung gestellte Phasengrenzfläche für die Auslegung des Verfahrens berücksichtigt werden müssen.

5.4.2 Optimierung des Partikeldurchmessers

Der Durchmesser der Einlassöffnung (Düse), durch welche die Kultursuspension bei der Durchführung der *in situ*-Extraktion in das Lösungsmitteln überführt wird, beeinflusst aus physikalischer und biologischer Sicht das Verfahren der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* maßgeblich (Hejazi et al. 2004b; Jackson et al. 2017; Schlüter 2018). Zum einen wird über den Durchmesser der Düse die Ausprägung der Kultursuspensionspartikel (Partikelentstehung, Durchmesser und Oberfläche) im Lösungsmittel beeinflusst. Dies wiederum beeinflusst das Verhalten der Partikel im Lösungsmittel (Turbulenz und Sinkgeschwindigkeit) und damit verbunden, die effektive Extraktionszeit und effektive Phasengrenzfläche der Kultursuspension zum Lösungsmittel beeinflusst (Schlüter 2018), was damit eine direkte Auswirkung auf die Extraktionseffizienz und Kulturvitalität ausübt (Jackson et al. 2017). Zum anderen entstehen je nach Durchmesser der Düse bei den austretenden Partikeln unterschiedliche hydrodynamische Scherkräfte, was im Fall von *Botryococcus braunii* zu einem Zerfall der Kolonien und damit verbunden zu einer Reduzierung der Kulturvitalität bei einer zu hohen Scherbeanspruchung führen kann (Jackson et al. 2019).

Für die Untersuchung zum Einfluss des Düsendurchmessers auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 wurde wie in Abschnitt 4.5.2, Abschnitt 4.5.3 und Tabelle 4-11 dargestellt, die benötigte Extraktionszeit bei den untersuchten Düsendurchmessern von 5, 4, 2 und 1 mm unter dem gewählten Extraktionssetup (Volumenstrom und Kultursuspensionsvolumen) anhand der für den jeweiligen Stamm als optimal ermittelten Extraktionszahl berechnet. Anhand der benötigten Extraktionszeit wurden dann *in situ*-Extraktionen über 10 Tage bei dem jeweiligen

Düsendurchmesser in 6,0 L FPA-Reaktoren mit einer Startbiomassekonzentration von 2,5 g_X L^{-1} durchgeführt. Der Einfluss des Kultivierungssystems im Vergleich zu den vorher in 3 L Blasensäulenreaktoren durchgeführten Extraktionsversuchen wird dabei in Abschnitt 5.5.1 diskutiert. Wie aus den in Abschnitt 4.5.3 dargestellten Ergebnissen deutlich wird, bewirkt eine Reduzierung des Düsendurchmessers von 5 über 4 zu 2 mm keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Biomassekonzentration und des Gehaltes an extrazellulären Kohlenwasserstoffen bei beiden untersuchten Stämmen. Eine weitere Reduzierung des Düsendurchmessers auf 1 mm führt hingegen zu einer signifikanten Abnahme der Biomassekonzentration und des Gehalts an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse über den Versuchszeitraum von 10 Tagen. Eine Ursache dafür kann in der durch die Düse erzeugten Scherbeanspruchung liegen (Hejazi et al. 2004b; Jackson et al. 2019). Bei gleichbleibendem Volumenstrom und gleichzeitiger Reduzierung des Düsendurchmessers kommt es an der Öffnung der Düse zu einer Erhöhung der Austrittsgeschwindigkeit und damit verbunden zu einer erhöhten Scherrate und Turbulenz. Die so entstehenden Kräfte können dabei zu einer Scherbeanspruchung führen, welche sowohl die Koloniestruktur bei *Botryococcus braunii*, als auch die Zellen nachhaltig schädigt, was somit zu einer Reduzierung der Biomasse führen kann (Hou et al. 2014). Bei dem in dieser Arbeit gewählten Extraktionssetup ergeben sich für die Düsendurchmesser von 5, 4, 2 und 1 mm eine Scherrate von respektive 106, 206, 1650 und 13200 s^{-1}. Jackson et al. 2018 konnten bereits bei einer Scherrate von 335 s^{-1} in einem gerührten System bei dem Stamm Bot22 eine partielle Zerstörung der Kolonien feststellen. Choi et al. 2013 konnten anhand der Bildung von Kolonieagglomeraten während der *in situ*-Extraktion des A Race Stammes UTEX 572 ebenfalls einen negativen Effekt auf das Wachstum bei zu hoher Scherbeanspruchung feststellen.

Für die Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen konnte mit der Reduzierung des Düsendurchmessers eine signifikante Steigerung bei beiden Stämmen festgestellt werden. Da über die Extraktionszahl sowohl die effektive Extraktionszeit als auch die Phasengrenzfläche durchmesserübergreifend konstant gehalten wurde, ist der Anstieg der Produktivität mit sinkendem Durchmesser ebenfalls auf die erhöhte Turbulenz durch die gesteigerte Düsenaustrittsgeschwindigkeit zurückzuführen. Die bei diesem Düsendurchmesser auftretenden Scherraten von über 13000 s^{-1} finden üblicherweise im Bereich der Homogenisierung statt (Senge et al. 2004) und sollen dabei zwei nicht mischbare Phasen so fein verteilen, dass diese beiden Phasen in einem höheren Mischgrad überführt und vom Verteilungszustand stabilisiert werden. Dies führt im Fall der *in situ*-Extraktion zu einer erhöhten Wechselwirkung zwischen Kultursuspension und Lösungsmittelphase und begründet die signifikant höheren Kohlenwasserstoffausbeuten bei einem Düsendurchmesser von 1 mm.

Eine Steigerung der Kohlenwasserstoffproduktivität durch Erhöhung der Scherrate konnte auch in den Studien von Jackson et al. 2018 und Jackson et al. 2019 für den Stamm Bot22 aufgezeigt werden. Unter den Stämmen konnten bei dem jeweiligen Düsendurchmesser keine signifikanten Unterschiede in der Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen festgestellt werden. Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Gehalt extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse und der Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen während der *in situ*-Extraktion.

Aufgrund der Beeinträchtigung des Wachstums der beiden Stämme bei einem Düsendurchmesser von 1 mm, wurde ein Düsendurchmesser von 2 mm für die weiteren Experimente als optimal erachtet. Für eine bessere Aussagekraft und Beurteilung der Ergebnisse aus den 10-tägigen *in situ*-Extraktionen zur Ermittlung des Einflusses des Düsendurchmessers wurden wie in Abschnitt 0 dargestellt, *in situ*-Extraktionen über 45 Tage bei einer Startbiomassekonzentration von 2,5 $g_X\ L^{-1}$ in 6,0 L FPA-Reaktoren unter der jeweils optimalen Extraktionszahl und Düsendurchmesser durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Extraktionssäulenbeschaffenheit über die bis dato genutzten glatten Extraktionssäulen im Vergleich zu rauen, mit Schikanen versehenen Extraktionssäulen untersucht. Diese rauen Extraktionssäulen sollten dabei die Turbulenz in der Lösungsmittelphase steigern, um die Kohlenwasserstoffausbeute zu erhöhen.

Bezüglich der durchschnittlichen Biomasseproduktivität im Kultivierungssystem konnte stammübergreifend und zwischen den beiden Extraktionssäulentypen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was verdeutlicht, dass auch über 45 Tage *in situ*-Extraktion vergleichend zu den in den vorherigen Abschnitten diskutierten Versuchen bei optimaler Extraktionszahl und optimierten Düsendurchmesser der negative Lösungsmitteleinfluss über das Wachstum der Kultur kompensiert wird. Darüber hinaus bestätigen diese Versuche, dass eine Übertragung der *in situ*-Extraktion unabhängig vom Kultivierungssystem anhand der Extraktionszahl realisiert werden kann, ohne das Wachstum negativ zu beeinflussen.

Der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse beeinflusst, wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, im direkten Maß die Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen im Verlauf der *in situ*-Extraktion. Für einen Düsendurchmesser von 2 mm konnten in den Versuchen zur Ermittlung des optimalen Düsendurchmessern kein negativer Effekt auf die Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe festgestellt werden, wohingegen bei dem Düsendurchmesser von 1 mm bereits nach 10 Tagen Extraktion eine signifikante Reduzierung der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse beobachtet wurde. Über den Verlauf der 45-tägigen Extraktionen konnte jedoch auch bei 2 mm Düsendurchmesser eine signifikante Abnahme der Konzentration

extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei beiden Stämmen und beiden Extraktionssäulen detektiert werden, was sich ebenfalls in der Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe widerspiegelt. Die Abnahme der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen betrug für den Stamm Showa unter glatter Extraktionssäule 8 % und unter rauer Extraktionssäule 23 %. Für den Stamm Bot22 lag die Abnahme bei beiden Extraktionssäulen bei ca. 15 %. Diese Werte verdeutlichen, dass die Kulturen über diesen Zeitraum der Extraktion nicht in der Lage sind, ausreichende Mengen extrazellulärer Kohlenwasserstoffe nachzubilden. Dieser Effekt scheint sich unter dem Einsatz der rauen Extraktionssäule mit erhöhter Turbulenz noch zu verstärken. Für den Stamm Bot22 konnten Jackson et al. 2019 eine Reduzierung der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe vor und nach dem Extraktionszyklus der *in situ*-Extraktion von bis zu 33,5 % feststellen, welche über den Verlauf von 3 Tagen ohne Extraktion nicht wieder vollständig regeneriert werden konnten. Für den gleichen Stamm konnte durch Moheimani et al. 2014 bei der *in situ*-Extraktion über 70 Tage eine optimale Zeit zur Erholung der Kultur von 5 Tagen ermittelt werden. Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurden täglich zwischen 2 und 3 % der extrazellulären Kohlenwasserstoffe über die *in situ*-Extraktion extrahiert. Wie bereits beschrieben, sind die Algen selbst bei dieser geringen Extraktionsrate nicht in der Lage, ausreichend Kohlenwasserstoff nachzubilden. Da keine Abnahme der Biomassekonzentration im System verzeichnet wurde, kann eine Schädigung der Zellen durch das Lösungsmittel weitestgehend ausgeschlossen werden. Als Ursache für die geringe, aber stetige Abnahme der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe kann unter anderem eine suboptimale Versorgung mit Nährstoffen gesehen werden. Während die Konzentration an Makroelementen über die tägliche Beprobung in einem konstanten Bereich gehalten wurde, konnten die Mikroelemente nicht überprüft werden und wurden in regelmäßigen Abständen von 14 Tagen entsprechend der Konzentration des BG11-Mediums zugegeben. Da das Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 45 Tagen nicht erneuert wurde, kann es hier zu einer Ab- oder Anreicherung des jeweiligen Mikronährstoff kommen, was am Beispiel eines Eisenmangels bei dem Stamm Bot22 in einer Reduzierung der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe resultiert (Tanoi et al. 2014).

Die durchschnittliche biomasseassoziierte Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen konnte im Vergleich zu den in Abschnitt 4.4.2 beschrieben und in Abschnitt 5.4.1 diskutierten Versuchen (3 L Blasensäulenreaktoren) für die 6,0 L FPA-Reaktoren, einem Düsendurchmesser von 2 mm und rauen Extraktionssäulen um 27 % auf 13,360 ± 1,980 $mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$ (Showa) und um 43 % auf 13,390 ± 2,190 $mg_{KW}\ g_X^{-1}\ d^{-1}$ (Bot22) gesteigert werden. Diese Steigerung ist neben dem optimierten Düsendurchmesser und der erhöhten Turbulenz der rauen Extraktionssäule auch auf das Kultivierungssystem zurückzuführen, dessen Einfluss in Abschnitt 5.5.1 diskutiert wird.

5.5 Optimierung der Kultivierungsbedingungen von *Botryococcus braunii*

Aufgrund der wachstumsassoziierten Bildung der langkettigen Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii*, als auch aufgrund der Zellzyklus-abhängigen Sekretion dieser Produkte, spielen neben den relevanten Einflussgrößen der Extraktion auch die Parameter, welche die Kultivierung beeinflussen eine entscheidende Rolle bei der Durchführung und dem Erreichen hoher Ausbeuten während der *in situ*-Extraktion. Wie bei allen Pflanzen wird das Wachstum und die Bildung langkettiger Kohlenwasserstoffe bei *Botryococcus braunii* durch eine Vielzahl an Umweltfaktoren, wie das zur Verfügung stehende Licht, die Temperatur, die Konzentration an Kohlenstoffdioxid und die Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst (Cheng et al. 2017; Gani et al. 2021; Kojima and Zhang 1999; Krzemińska et al. 2014; Ranga Rao et al. 2007). Aufgrund der Tatsache, dass sich alle kultivierungsrelevanten Parameter gegenseitig beeinflussen können, wurde aus Kapazitätsgründen auf eine Kombination der untersuchten Parameter verzichtet. Stammspezifisch wurden zunächst die Optima bezüglich des Hell/Dunkel-Zyklus, der Temperatur und der initialen Nährstoffkonzentration an Stickstoff, Phosphor, Magnesium, Calcium und Eisen untersucht. Um eine negative gegenseitige Beeinflussung der ermittelten Optima auszuschließen, wurde abschließend eine Vergleichskultivierung zwischen den bis dato verwendeten Standardbedingungen und den zusammengeführten optimierten Parametern durchgeführt.

5.5.1 Einfluss des Lichteintrags (Scale-up) und des Hell/Dunkel-Zyklus

Einer der größten Einflussfaktoren bei der Kultivierung von Mikroalgen ist durch das verwendete Kultivierungssystem gegeben, da über das verwendete System alle für das Wachstum relevanten Wachstumsfaktoren zur Verfügung gestellt werden (Borowitzka 2018a). Für photoautotrophes Wachstum und aus dem Grund, dass die Grundbausteine der langkettigen Kohlenwasserstoffe bei den *Botryococcus braunii* Stämmen der B-Race über den MEP-Stoffwechselweg in Plastiden der Zellen synthetisiert werden (Metzger and Largeau 2005), ist eine optimale Versorgung mit Licht als Energiequelle für diese Prozesse einer der wichtigsten Einflussfaktoren für die Kultivierung, als auch für die *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* und damit ein essentielles Hauptkriterium an das Kultivierungssystem (Zuccaro et al. 2020). Grundsätzlich weist jedes Kultivierungssystem für Mikroalgen spezielle Vor- und Nachteile auf, welche für jeden Algenstamm separat betrachtet werden müssen (Borowitzka 2018a; Matthes 2020). Für die Übertragung der Kultivierung und *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* auf einen größeren Kultivierungsmaßstab wurde sich an der Hochschule Anhalt für die Flat-Panel Airlift-Reaktortechnologie (FPA-Reaktor) der Firma Subitec entschieden. Dieses Photobioreaktorsystem bietet aufgrund der Geometrie (Münkel et al. 2013) eine intensive Durchmischung der Kultursuspension, was in Verbindung mit der

großen Oberfläche und der geringen Schichtdicke eine gute Versorgung der Algenkultur mit Licht gewährleistet (Schmid-Staiger et al. 2009). Darüber hinaus ist dieses System in drei unterschiedlichen Größen (6, 28 und 180 L) verfügbar, was ein Scale-up des Verfahrens der *in situ*-Extraktion unter gleichbleibenden Kultivierungsbedingungen ermöglicht. Bezüglich des Lichteintrags in das Kultivierungssystem (Tabelle 3-5) wird deutlich, dass im Vergleich zu dem 1,5 L Blasensäulenreaktor, welcher für Kultivierungsversuche zur Optimierung des Wachstums genutzt wurde, das 6,0 L FPA-Reaktorsystem der Firma Subitec mit 0,24 m^2 das ca. 5-fache an photoaktiver Fläche zur Verfügung stellt. Betrachtet man die auf das Kulturvolumen (=photoaktives Volumen) bezogene photoaktive Fläche (Surface-to-Volume ratio SVR) der beiden Systeme ergibt sich mit 0,04 m^2 L^{-1} für den 6,0 L FPA-Reaktor eine um ca. 25 % gesteigerte SVR gegenüber der 1,5 L Blasensäule mit 0,031 m^2 L^{-1}. Diese Steigerung der SVR durch den Wechsel des Kultivierungssystems (1,5 L Blasensäule zu 6,0 L FPA-Reaktor) spiegelt sich bei beiden *Botryococcus braunii* Stämmen im direkten Maß in der Biomasseproduktivität wider. Diese lag für den Stamm Showa in den FPA-Reaktoren 64 % über der in den 1,5 L Blasensäulen und für den Stamm Bot22 ca. 24 % über der der 1,5 L Blasensäulen. Die bei dem Stamm Showa wesentlich höhere Steigerung der volumetrischen Biomasseproduktivität gegenüber dem Stamm Bot22 durch die für beide Stämme identische Erhöhung des Lichteintrags ergibt sich aus den stammspezifischen Optima. Wie bei allen pflanzlichen Organismen wirkt sich auch bei *Botryococcus braunii* eine zu niedrige Beleuchtungsintensität limitierend und eine zu hohe Beleuchtungsintensität inhibierend auf das Wachstum und die Kohlenwasserstoffsynthese aus (Skjånes et al. 2013). Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Beleuchtungsintensität für den *Botryococcus braunii* Stamm Bot22 ergaben, dass bei einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} ein optimales Wachstum vorherrscht und bei 200 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} die größte Menge an Kohlenwasserstoffen produziert wird (Sakamoto et al. 2012). Für den Stamm Showa wurde ein optimales Wachstum und eine optimale Kohlenwasserstoffsynthese im Bereich von 240 bis 850 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} ermittelt (Yoshimura et al. 2013). Dies lässt darauf schließen, dass der Stamm Showa für ein optimales Wachstum eine deutlich höhere Lichtintensität gegenüber dem Stamm Bot22 benötigt. Wie bereits in Abschnitt 5.3 diskutiert, kann dies auf die stammspezifische Morphologie und Kompaktheit der Kolonien zurückgeführt werden. Da in den Versuchen in dieser Arbeit ebenfalls mit einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} kultiviert wurde, wurde durch die Erhöhung der photoaktiven Fläche über den Wechsel des Kultivierungssystems der Lichteintrag deutlich in Richtung des Optimums für den Stamm Showa verschoben, wohingegen für den Stamm Bot22 in den 1,5 L Blasensäulen der Lichteintrag schon näher am Optimum lag und damit den höheren Anstieg der Biomasseproduktivität für den Stamm Showa erklärt. Gleiches gilt auch für die Konzentration

an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse. Durch den Wechsel des Kultivierungssystems und damit verbunden die Erhöhung des Lichteintrages, konnte die durchschnittliche Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in den FPA-Reaktoren verglichen zu den Blasensäulen-Reaktoren für den Stamm Showa um ca. 15 % und für den Stamm Bot22 um ca. 9 % gesteigert werden. Diese Steigerung resultiert zum einen aus der biomasseassoziierten Kohlenwasserstoffbildung bei *Botryococcus braunii* (Kojima and Zhang 1999) und zum anderen aus der vom Zellzyklus abhängigen Sekretion der Kohlenwasserstoffe, welche bei dem Stamm Showa (Suzuki et al. 2013; Suzuki et al. 2018; Weiss et al. 2012), als auch bei dem Stamm Bot22 (Abschnitt 4.3.2 und Abschnitt 5.3) im Prozess der Zellteilung stattzufinden scheint.

Neben der Lichtintensität spielt auch die Beleuchtungszeit in Form von Hell/Dunkel-Zyklen eine wichtige Rolle für das Wachstum von Mikroalgen (Krzemińska et al. 2014) und beeinflusst in der Natur über sich ändernde Lichtintensitäten und Beleuchtungszeiten die biochemische Zusammensetzung der Algenbiomasse (Amini Khoeyi et al. 2012). Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen hervorgeht, konnte das beste Wachstum und die höchste Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei den beiden untersuchten *Botryococcus braunii* Stämmen Showa und Bot22 bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00, also unter Dauerbeleuchtung gemessen werden. Für die Stämme SAG 30.81 (Krzemińska et al. 2014), ACOI 58 (Lupi et al. 1994) und KMITL 2 (Ruangsomboon 2012) konnte ebenfalls das beste Wachstum bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 bestimmt werden. Der optimale Hell/Dunkel-Zyklus scheint dabei maßgeblich durch die zur Verfügung stehende Energiemenge bzw. Lichtintensität, als auch durch die Art der Zellteilung beeinflusst zu werden (Krzemińska et al. 2014). Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden bei einer Lichtintensität von 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} durchgeführt, was nach den Untersuchungen von Yoshimura et al. 2013 deutlich unter der für den Stamm Showa optimalen Lichtintensität liegt. Bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 14/10 und einer Lichtintensität von 850 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} konnten Yoshimura et al. 2013 eine spezifische Wachstumsrate von 0,50 d^{-1} ermitteln, welche vergleichbar mit der von Wolf et al. 1985 ermittelten Wachstumsrate von 0,42 d^{-1} unter 250 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 ist. Diese Werte lassen darauf schließen, dass sich mit steigender Lichtintensität die optimale Beleuchtungszeit reduziert.

5.5.2 Einfluss der Temperatur

Neben dem zur Verfügung stehenden Licht, wirkt sich eine veränderte Temperatur direkt auf das Wachstum von Mikroalgen, als auch auf die intrazellulären Prozesse zur Bildung der Metabolite des Stoffwechsels aus (Harwood and Jones 1989), wobei jede Alge ein stammspezifisches Optimum bezüglich der Wachstumstemperatur aufweist (Lupi et al. 1991). Dieses stammspezifische Optimum der Wachstumstemperatur wird aus den in Abschnitt 4.6.1 beschriebenen Versuchen zur Optimierung der Kultivierungstemperatur der beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 ersichtlich. Die höchste Biomasseproduktivität für den Stamm Showa wurde bei einer Temperatur von 28 °C gemessen. Dies bestätigt die Untersuchungen von Yoshimura et al. 2013, welche ebenfalls eine optimale Wachstumstemperatur zwischen 28 °C und 30 °C für den Stamm Showa ermittelt haben. Demgegenüber konnte bei dem Stamm Bot22 eine optimale Wachstumstemperatur von 30 °C ermittelt werden. Bezüglich des Gehaltes an extrazellulären Kohlenwasserstoffen konnte für beide Stämme das Optimum bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C ermittelt werden. Der Unterschied zwischen der optimalen Wachstumstemperatur und der optimalen Temperatur zur Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe ist dabei höchstwahrscheinlich auf das Temperaturoptimum der Enzymaktivität des Enzyms DXS des MEP-Synthesewegs zurückzuführen (Abbildung 2-5). Das Enzym DXS katalysiert dabei die Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu DOXP, welches dann über den MEP-Stoffwechselweg zu den Grundbausteinen der Isoprenoid-Synthese IPP und DMAPP transponiert wird (Metzger and Largeau 2005). Als Temperaturoptimum des Enzyms DXS konnten Matsushima et al. 2012 eine Temperatur von 32 °C bis 34 °C ermitteln, welche mit dem in dieser Arbeit ermittelten Temperaturoptimum der Bildung extrazellulärer Kohlenwasserstoffe übereinstimmt.

Aufgrund der wachstumsassoziierten Synthese der langkettigen Kohlenwasserstoffe in *Botryococcus braunii* (Kojima and Zhang 1999), als auch aufgrund der direkten Korrelation zwischen der Produktivität extrahierter Kohlenwasserstoffe während der *in situ*-Extraktion und der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen in der Biomasse von *Botryococcus braunii* spielen beide Faktoren (Wachstum und Kohlenwasserstoffgehalt der Biomasse) für das Verfahren der *in situ*-Extraktion eine entscheidende Rolle. Da diese beiden Einflussgrößen, wie vorher beschrieben, unterschiedliche Temperaturoptima aufweisen, muss für das Verfahren der *in situ*-Extraktion ein Kompromiss gefunden werden, welcher in der biomassebezogenen Kohlenwasserstoffproduktivität gesehen werden kann. Wie in Tabelle 4-14 dargestellt, ist diese für den Stamm Showa bei einer Temperatur von 28 °C und für den Stamm Bot22 bei 30° C am höchsten. Darauf basierend kann eine Kultivierungstemperatur

von 28 °C für den Stamm Showa und von 30 °C für den Stamm Bot22 als optimal für die Durchführung der *in situ*-Extraktion dieser beiden Stämme erachtet werden.

5.5.3 Einfluss der initialen Nährstoffkonzentration

Wie bei allen Pflanzen benötigt die Mikroalge *Botryococcus braunii* Nährstoffe für den Aufbau der Biomasse und zur Versorgung der intrazellulären Stoffwechselwege. Diese Nährstoffe lassen sich in Makroelemente wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor, Kalium, Calcium, Schwefel und Magnesium, welche mengenmäßig am meisten im Kulturmedium vertreten sind und in Mikroelemente wie beispielsweise Eisen, Chlor, Bor, Mangan, Zink, Kupfer, Molybdän und Nickel, welche in geringer Konzentration im Kulturmedium vorhanden sind, unterteilen (Borowitzka 2018b). Neben der physiologischen Beeinflussung der Mikroalgen, welche ausführlich durch Borowitzka 2018b beschrieben werden, wird auch die Rentabilität für die Herstellung von Mikroalgenprodukten durch die unterschiedlichen Nährmedienkomponenten beeinflusst (Chaudry et al. 2018; Jackson et al. 2020). Die Versorgung der Mikroalgenkulturen mit Nährstoffen macht dabei zwischen 3 und 10 % der Gesamtkosten aus (Acién et al. 2012). Für die standardmäßige Kultivierung der in dieser Arbeit untersuchten *Botryococcus braunii* Stämme wurde das BG11-Medium nach Rippka et al. 1979 genutzt, da ein Wachstum aller untersuchten Stämme auf diesem Medium beobachtet werden konnte (Abschnitt 4.2.1). Aufgrund dessen, dass dieses Medium ursprünglich für die Kultivierung von Cyanobakterien konzipiert wurde (Stanier and Cohen-Bazire 1977) und jeder Algenstamm ein spezifisches Optimum bezüglich des Nährstoffbedarfs aufweist (Borowitzka 2018b), wurde der Einfluss der initialen Konzentration an Stickstoff, Phosphor, Magnesium, Calcium und Eisen des BG11-Mediums auf die beiden *Botryococcus braunii* Stämme Showa und Bot22 zur Abschätzung des optimalen Konzentrationsbereiches für das Verfahren der *in situ*-Extraktion untersucht.

Wie aus den in Abschnitt 4.6.3 dargestellten Ergebnissen ersichtlich wird, führt eine Reduzierung der initialen Stickstoffkonzentration bei beiden Stämmen zu einer Steigerung der Biomasseproduktivität, wohingegen die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen nicht merklich beeinflusst wird. Unter Zusammenführung dieser beiden Parameter ergibt sich bei beiden Stämmen bezüglich der Kohlenwasserstoffproduktivität eine optimierte initiale Stickstoffkonzentration, welche der Hälfte der ursprünglichen Konzentration des BG11-Mediums entspricht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Al-Hothaly et al. 2016, welche ebenfalls für zwei B-Race Stämme eine optimale Stickstoffkonzentration des BG11-Mediums von der Hälfte der ursprünglichen Konzentration ermitteln konnten. Bezüglich des Stoffmengenanteils von Stickstoff im Medium konnte für die beiden Stämme Showa und Bot22 somit eine optimale Konzentration von 10,71 mmol L^{-1} ermittelt werden. Dieser Wert

liegt ebenfalls in einem Bereich, welcher für den Stamm UC58 mit 8 mmol L^{-1} durch Lupi et al. 1994 oder für den Stamm KMITL zwischen 7 und 14 mmol L^{-1} durch Ruangsomboon 2015 ermittelt wurde. Diese Werte zeigen, dass die optimale Stickstoffkonzentration im Medium stammspezifisch ist, sich bei *Botryococcus braunii* stammübergreifend aber in einem Bereich zwischen 7 und 14 mmol L^{-1} bewegt.

Bezüglich der Konzentration an Phosphor im Kulturmedium konnte für den Stamm Showa ein gesteigertes Wachstum und für beide Stämme Showa und Bot22 eine gesteigerte Kohlenwasserstoffkonzentration in der Biomasse durch eine Verdopplung der ursprünglichen Konzentration des BG11-Mediums gemessen werden. Die in dieser Arbeit ermittelte optimierte Konzentration an Phosphor im Kulturmedium beläuft sich damit auf 12,46 mg L^{-1} bzw. 0,4 mmol L^{-1}. Auf Grundlage von den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine weitere Erhöhung der Phosphorkonzentration im Kulturmedium eine weitere Erhöhung von Biomasseproduktivität und Kohlenwasserstoffkonzentration zufolge hat. In Versuchen von Ruangsomboon 2012 konnte für den Stamm KMITL 2 eine optimale Konzentration an Phosphor von 444 mg L^{-1} für das Wachstum und von 222 mg L^{-1} für die Lipidbildung ermittelt werden. Abgesehen davon, dass wie bei der Stickstoffkonzentration jeder Stamm auch bei der Phosphorkonzentration ein spezifisches Optimum besitzt, zeigen die Untersuchungen von Ruangsomboon 2012 das Potential einer weiteren Steigerung der Phosphorkonzentration, was explizit im Zusammenhang mit dem Verfahren der *in situ*-Extraktion untersucht werden sollte. Casadevall et al. 1985 konnten ermitteln, dass für den Stamm SAG 807-1 die initiale Konzentration an Phosphor (abgesehen von einer kompletten Limitierung) wenig entscheidend für das anfängliche Wachstum ist, da Phosphor von den Zellen zunächst in einer höheren als benötigten Konzentration aufgenommen und gespeichert wird. Bezüglich der Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen konnten Casadevall et al. 1985 ebenfalls eine Steigerung mit erhöhter Konzentration an Phosphor feststellen. Das lässt darauf schließen, dass während der *in situ*-Extraktion auf eine konstante und ausreichend hohe Konzentration an Phosphor geachtet werden muss, wobei kurzzeitige Limitierungen aufgrund der Speicherung keinen Einfluss haben dürften.

Für die Ermittlung der optimalen Magnesiumkonzentration konnte bei beiden Stämmen Showa und Bot22 eine Steigerung des Wachstums und der Kohlenwasserstoffproduktivität durch Reduzierung der ursprünglichen Konzentration des BG11-Mediums um die Hälfte auf 7,3 mg L^{-1} Magnesium gemessen werden. Dahingegen konnten Tran et al. 2010 für den Stamm LB572 eine optimale Magnesiumkonzentration von ca. 18 mg L^{-1} ermitteln, was den Stamm-spezifischen Bedarf an Magnesium widerspiegelt.

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zum Einfluss der Konzentration an Calcium im Nährmedium konnte unter der kompletten Eliminierung von Calcium eine Steigerung des Wachstums und der Kohlenwasserstoffproduktivität ermittelt werden. Diese Ergebnisse stehen dabei im Widerspruch mit der Literatur. Zum einen spielt Calcium bei der Signalweiterleitung in Pflanzen eine entscheidende Rolle und beeinflusst fast alle Wachstumsprozesse (Hepler 2005) und zum anderen wird Calcium in allen für die Kultivierung von *Botryococcus braunii* genutzten Nährmedien eingesetzt (Dayananda et al. 2007). Im Vergleich zu dem BG11-Medium mit einer Calciumkonzentration von 9,86 mg L^{-1} wird in vielen anderen Nährmedien eine wesentlich geringere Konzentration an Calcium eingesetzt (Dayananda et al. 2007). Weetall 1985 konnte an dem die *Botryococcus braunii* Zellen umgebendem Mantel Calciumablagerungen feststellen, welche als Calciumreservoir fungieren könnten. Zusammen mit der geringeren Calciumkonzentration in anderen Nährmedien kann vermutet werden, dass *Botryococcus braunii* für das Wachstum eine nur sehr geringe Calciumkonzentration benötigt und durch die Ablagerungen am Zellmantel ein Calciumreservoir besitzt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass geringste Mengen an Calcium aus den Vorkulturen in die beprobten Kulturen überführt wurden und Calcium vom Zellmantel zur Verfügung steht, würde dies auch ein Wachstum unter limitierten Bedingungen begründen.

Die Erhöhung, als auch die Verringerung der Eisenkonzentration im Kulturmedium führte bei beiden Stämmen zu keiner positiven Beeinflussung des Wachstums und der Kohlenwasserstoffproduktivität, womit die im BG11-Medium ursprüngliche Konzentration von 6 mg L^{-1} Ammoniumeisen-(III)-Citrat zunächst als optimal erachtet werden kann und mit den Ergebnissen von Ruangsomboon 2012 für den Stamm KMITL 2 einhergehen. Für den Stamm KMITL 2 konnte ebenfalls keine wesentliche Beeinflussung des Wachstums durch Variation der Eisenkonzentration beobachtet werden. Abgesehen vom Wachstum konnte für den Stamm Bot22 durch Tanoi et al. 2014 eine wesentliche Beeinflussung der Koloniemorphologie beobachtet werden. Unter einer Limitierung von Eisen konnte eine starke Abnahme der Wachstumsrate, als auch eine Ausprägung der Kolonien mit loseren Zellverbänden festgestellt werden. Mit Hinblick auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion sollte eine Limitierung von Eisen vermieden werden, da diese loseren Kolonien, wie bereits in vorherigen Abschnitten diskutiert, zu einer Reduzierung der Lösungsmittelverträglichkeit führen würden.

5.5.4 Zusammenführung der Kultivierungsoptimierungen von Temperatur, Hell/Dunkel-Zyklus und initialer Nährstoffkonzentration

Da aus Kapazitätsgründen in dieser Arbeit keine statistische Versuchsplanung zur Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der kultivierungsrelevanten Parameter erfolgt ist und um eine gegenseitige negative Beeinflussung der einzelnen Optimierungen auszuschließen, wurden die einzeln optimierten Kultivierungsparameter für den jeweiligen Stamm Showa bzw. Bot22 zusammengeführt und mit einer Kultivierung unter Standardbedingungen verglichen. Wie aus den in Abschnitt 4.6.4 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, konnte durch Zusammenführung der einzelnen Optimierungen im Vergleich zu den Standardbedingungen die Biomasseproduktivität für den Stamm Showa um 22 % und für den Stamm Bot22 um 34 % gesteigert werden. Darüber hinaus konnte die Konzentration an extrazellulären Kohlenwasserstoffen für den Stamm Showa um 43 % und für den Stamm Bot22 um 40 % gesteigert werden, was in einer Steigerung der Kohlenwasserstoffproduktivität für den Stamm Showa um 74 % und für den Stamm Bot22 um 87 % resultiert. Anhand dieser Werte wird für beide Stämme ersichtlich, dass in jeder Kategorie durch die Zusammenführung der Optimierungen ein höherer Wert, als in den jeweils einzelnen Optimierungen erreicht wird und eine negative gegenseitige Beeinflussung zunächst ausgeschlossen werden kann. In den jeweiligen einzelnen Optimierungen konnte die größte Steigerung in Verbindung mit der Temperatur, der Phosphorkonzentration und der Magnesiumkonzentration ermittelt werden, welche dann in Kombination wahrscheinlich diese Steigerung hervorrufen. Diese Vermutung wird auch durch die Untersuchungen von Tran et al. 2010 bekräftigt, welche bei dem Stamm LB572 über statistische Versuchsplanung neben der Lichtintensität, die Konzentration an Phosphor und Magnesium als hauptsächliche Einflussfaktoren zur Steigerung der Biomasse und der Lipidkonzentration ermitteln konnten.

Somit können als Anwendungsgrößen der durchgeführten Kultivierungsoptimierungen für das Verfahren der *in situ*-Extraktion für den Stamm Showa eine Temperatur von 28 °C und für den Stamm Bot22 von 30 °C, ein Hell/Dunkel-Zyklus von 24/00 und die in Tabelle 3-4 aufgeführten initialen Nährstoffkonzentrationen für weitere Versuche als optimal erachtet werden.

5.6 *In situ*-Extraktion unter optimierten Extraktions- und Kultivierungsbedingungen

Unter der Zusammenführung aller optimierten Parameter (Kultivierung und Extraktion) wurde der Stamm Showa einer Langzeit-*in situ*-Extraktion über 80 Tage unterzogen (Abschnitt 4.7). Die Biomassekonzentration konnte vergleichend zu den vorher durchgeführten Extraktionen mit einer durchschnittlichen Biomasseproduktivität von 0,002 ± 0,112 $g_X\ L^{-1}\ d^{-1}$ über 80 Tage ebenfalls auf einem gleichbleibenden Niveau gehalten werden. Dies verdeutlicht, dass auch über 80 Tage Extraktion unter den gewählten Bedingungen keine wesentliche Schädigung der Kultur durch die Extraktion auftritt. Durch Anwendung der kultivierungsseitig durchgeführten Optimierungen (Temperatur und Nährstoffe) konnte die durchschnittliche Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse von 0,468 ± 0,041 auf 0,496 ± 0,055 $g_{EKW}\ g_X$ gesteigert werden. Diese Erhöhung spiegelt sich sowohl in der volumetrischen als auch in der biomassespezifischen Produktivität wider, welche im Vergleich zu den in Abschnitt 0 dargestellten und in Abschnitt 5.4.2 diskutierten Versuchen um respektive 21 bzw. 18 % gesteigert werden konnte. Die in Abschnitt 5.4.2 diskutierte Abnahme der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse konnte auch in der Extraktion über 80 Tage festgestellt werden. Mit einer Reduzierung der durchschnittlichen Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe von 13,75 % über 80 Tage bzw. 0,17 % pro Tag lag diese jedoch deutlich unter der Reduzierung der in Abschnitt 5.4.2 diskutierten Versuche, bei denen eine Abnahme von 22,31 % über 45 Tage bzw. 0,50 % pro Tag festgestellt werden konnte. Dies zeigt, dass die Anwendung der kultivierungsseitigen Optimierungen einen kompensierenden Effekt ausübt. Dessen ungeachtet, sind trotz optimierter Kultivierung die Zellen nicht in der Lage ausreichende Mengen Kohlenwasserstoffe nachzubilden, um den extrahierten Anteil von durchschnittlich 3,2 % zu kompensieren. Diese Lücke könnte in zukünftigen Versuchen durch eine weitere Steigerung des Wachstums oder durch eine Erhöhung des Partikeldurchmessers geschlossen werden. Vor allem durch eine Erhöhung der Lichtintensität, welche für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bei 100 µmol Photonen $m^{-2}\ s^{-1}$ lag, ist eine deutliche Steigerung der Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen zu erwarten, da für den Stamm Showa die optimale Lichtintensität ungeachtet vom Reaktorsystem zwischen 250 und 850 µmol Photonen $m^{-2}\ s^{-1}$ zu liegen scheint (Yoshimura et al. 2013). Darüber hinaus könnte durch eine Erhöhung der Lichtintensität auch die durchschnittliche Biomasse im Kultivierungssystem gesteigert werden, was wiederum zu einer Erhöhung der volumetrischen Kohlenwasserstoffproduktivität führen kann.

Die in dieser Arbeit erzielte durchschnittliche volumetrische Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen von 41,380 ± 6,283 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} über 80 Tage Extraktion ist vergleichend zu Tabelle 2-4 und den durch Jackson et al. 2020 zusammengetragenen Werten zum aktuellen Zeitpunkt die höchste erzielte Produktivität für das Verfahren der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii*. Im Vergleich zu den für *Botryococcus braunii* erzielten Kohlenwasserstoffproduktivitäten nach dem klassischen Verfahrensschema (Abbildung 1-1), welche wie in Tabelle 5-1 und durch Jackson et al. 2020 zusammengefasst, mit wenigen Ausnahmen in einem Bereich zwischen 0,009 und 0,121 g_{KW} L^{-1} d^{-1} liegen, ist die in dieser Arbeit erreichte Kohlenwasserstoffproduktivität von 0,041 ± 0,006 g_{KW} L^{-1} d^{-1} im Mittelfeld angesiedelt. Dabei ist zu erwähnen, dass für *Botryococcus braunii* zumeist theoretisch ermittelte Produktivitäten angegeben werden, welche anhand der Biomassezunahme und des Anteils an extrazellulären Kohlenwasserstoffen ermittelt werden und damit im realen Prozess durch Verluste innerhalb der Prozesskette deutlich geringer ausfallen sollten. Für die Kultivierung des Stammes Bot22 in Open Ponds gehen Jackson et al. 2020 bei durchgeführten Hochrechnungen von einer maximalen Flächenproduktivität an Kohlenwasserstoffen von 13,4 g_{KW} m^{-2} d^{-1} aus, was einer volumetrischen Produktivität von ca. 45 mg_{KW} L^{-1} d^{-1} entspricht. Ungeachtet des Kultivierungssystems liegt die in dieser Arbeit erzielte Produktivität damit im gleichen Bereich wie durch Jackson et al. 2020 ermittelt. Für den gleichen Stamm (Bot22) haben Chaudry et al. 2018 eine techno-ökonomische Analyse durchgeführt, anhand welcher die Extraktionseffizienz und der Gehalt extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse als Schlüsselgrößen für eine wirtschaftliche Prozessführung der *in situ*-Extraktion identifiziert wurden. Darüber hinaus konnten Chaudry et al. 2018 im Vergleich zur Extraktion von Lipiden aus Mikroalgen mit einem Lipidanteil von 30 % und einer Flächenproduktivität von 20 g_X m^{-2} d^{-1} unter herkömmlicher Extraktion der Lipide eine vergleichbare Rentabilität der *in situ*-Extraktion bei einer Produktivität an Kohlenwasserstoffen von 9 g_{KW} m^{-2} d^{-1}, also 0,03 g_{KW} L^{-2} d^{-1} ermitteln. Da diese Betrachtung für die Kultivierung in Open Ponds erfolgte, ist bei der Kultivierung in geschlossen Reaktoren mit einer niedrigeren Rentabilität zu rechnen, da die Betriebs- und Investitionskosten für geschlossene Systeme wesentlich höher liegen (Borowitzka and Moheimani 2013). Darüber hinaus ist bei der Betrachtung dieser Zahlen zu beachten, dass die Grundlage zur Berechnung der Modelle oftmals theoretischer Natur ist und die zugrundeliegenden Werte aus Kurzeitversuchen im Labor resultieren. Für eine verlässliche Aussage zur Abschätzung der Kosten des Verfahrens der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* muss daher ein weiteres Scale-up in den Pilotmaßstab erfolgen.

Unter der Zusammenführung aller optimierten Parameter konnte in dieser Arbeit für den Stamm Showa über 80 Tage *in situ*-Extraktion eine Gesamtausbeute an Kohlenwasserstoffen

von 3,311 ± 0,503 g_{KW} L^{-1} erzielt werden. Damit konnten über 80 Tage ca. 126 % der durchschnittlichen im Kultivierungssystem befindlichen Biomassekonzentration als Kohlenwasserstoffe extrahiert werden. Bereits nach 32 Tagen Extraktion konnte der gesamte Anteil an Kohlenwasserstoffen (49,6 % der Biomasse) und nach 64 Tagen die doppelte Konzentration an Kohlenwasserstoffen, welche durchschnittlich in der Biomasse vorhanden war extrahiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Prinzip des Verfahrens der *in situ*-Extraktion unter wiederholter Extraktion ein und derselben Kultur funktioniert.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Produktion von Mikroalgen für die Gewinnung von für den Menschen nützlichen Substanzen bietet ein enormes Potential als Beitrag zur Lösung globaler Probleme des 21. Jahrhunderts. Speziell die Nutzung extrazellulärer Verbindungen und damit verbunden die Anwendung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion zur Gewinnung dieser Verbindungen kann dazu beitragen, die Aufarbeitungskosten zu reduzieren. Durch Einsparung der kostenintensiven Aufarbeitungsschritte der Ernte, Trocknung und des Zellaufschlusses bietet sich die Möglichkeit, die Rentabilität für die Produktion von Niedrigpreisprodukten aus Mikroalgen, wie beispielsweise Bioenergieträger, zu erhöhen.

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnten wesentliche, die *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* betreffende biotische und abiotische Einflussparameter aufgezeigt und optimiert werden. Anhand des Vergleiches von 12 verschiedenen *Botryococcus braunii* Stämmen hinsichtlich extraktionsrelevanter Eigenschaften wie Wachstum, Kohlenwasserstoffgehalt, Lösungsmittelkompatibilität und Nährstoffverbrauch konnten die zwei *Botryococcus braunii* B-Race Stämme Showa und Bot22 als potenzielle Kandidaten für das Verfahren der *in situ*-Extraktion identifiziert werden. Über die Optimierung der Extraktionszeit unter Anwendung der Extraktionszahl, welche sich aus effektiver Extraktionszeit und Phasengrenzfläche zusammensetzt, wurde das Verfahren der *in situ*-Extraktion erfolgreich von 3,0 L Blasensäulenreaktoren auf 6,0 L FPA-Reaktoren übertragen. Durch die Korrelation der Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe in der Biomasse und der Produktivität an extrahierten Kohlenwasserstoffen im Laufe der *in situ*-Extraktion konnte ein wichtiger Einflussparameter auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion zur Optimierung der Kultivierung von *Botryococcus braunii* identifiziert werden. Darauf basierend wurde über die stammspezifische Optimierung der Kultivierungstemperatur, der initialen Nährstoffkonzentration und des Hell/Dunkel-Zyklus der Gehalt an extrazellulären Kohlenwasserstoffen sowie das Wachstum der beiden Stämme Showa und Bot22 signifikant gesteigert. Durch die Zusammenführung aller durchgeführten Optimierungen konnte abschließend eine 80-tägige *in situ*-Extraktion des Stammes Showa erfolgreich realisiert werden, wobei eine Gesamtausbeute an Kohlenwasserstoffen von ca. 125 % der durchschnittlichen im Kultivierungssystem befindlichen Biomasse erzielt wurde.

Mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen konnten wesentliche Gemeinsamkeiten der Stämme Bot22 und Showa bezüglich des Mechanismus der Koloniebildung und der Kohlenwasserstoffsekretion festgestellt werden. Darüber hinaus wurden wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Koloniemorphologie dieser beiden Stämme und deren Einfluss auf das Verfahren der *in situ*-Extraktion aufgezeigt. Anhand des Vergleichs der untersuchten

Stämme über der Primär- und Sekundärstruktur der ITS2 Regionen, der unterschiedlichen Synthesewegen der gebildeten Kohlenwasserstoffe sowie der klimatischen Bedingungen am Isolationsort konnte bestätigt werden, dass sich die Mikroalge *Botryococcus braunii* aus evolutionärer Sicht in zwei sich abgrenzende Abstammungslinien (Stämme der A-Race und Stämme der B/L-Race) zuordnen lässt. Die Analyse dieses Sequenzmarkers kann zukünftig genutzt werden, um eine gezielte Zuordnung neuer *Botryococcus braunii* Isolate zu den entsprechenden Races vorzunehmen, ohne aufwändige Analysen der chemischen Kohlenwasserstoffstruktur durchzuführen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bilden eine vielversprechende Grundlage für die weitere Optimierung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* und verdeutlichen, dass dieses Verfahren zur Reduzierung der Herstellungskosten von für den Menschen nützlichen Verbindungen aus Mikroalgen beitragen kann. Die unter optimierten Bedingungen erzielte volumetrische Kohlenwasserstoffproduktivität über 80 Tage Extraktion liegt mit ca. 0,041 $g_{KW}\,L^{-1}\,d^{-1}$ zwar noch deutlich unter der Lipidproduktivität anderer Mikroalgen, jedoch lassen sich die Aufarbeitungskosten durch Einsparung der Ernte, der Trocknung und des Zellaufschlusses über das Verfahren der *in situ*-Extraktion reduzieren. Für eine detaillierte Betrachtung der Rentabilität des Verfahrens der *in situ*-Extraktion ist ein weiteres Scale-up in den Pilotmaßstab unabdingbar. Großes Potential für die Verbesserung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion liegt in der Steigerung des Lichteintrages, was zu einer Erhöhung der Biomassekonzentration im Kultivierungssystem und damit zu einer deutlichen Steigerung der volumetrischen Kohlenwasserstoffproduktivität beitragen kann. Darüber hinaus besteht zukünftig ein großes Potential in der Anwendung des Verfahrens der *in situ*-Extraktion von Mikroalgen, da aufgrund zunehmender Fortschritte auf dem Gebiet des *Genetic Engineering* möglich wird, Stoffwechselkaskaden in Mikroalgen zu implementieren, welche die aktive Sekretion intrazellulär gebildeter Substanzen erlaubt.

7 Literaturverzeichnis

Abdulqader G, Barsanti L, Tredici MR (2000) Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. J Appl Phycol 12:493–498. https://doi.org/10.1023/A:1008177925799

Abomohra AE-F, El-Sheekh M, Hanelt D (2014) Extracellular secretion of free fatty acids by the chrysophyte *Ochromonas danica* under photoautotrophic and mixotrophic growth. World J Microbiol Biotechnol 30:3111–3119. https://doi.org/10.1007/s11274-014-1738-5

Achitouv E, Metzger P, Rager M-N, Largeau C (2004) C31-C34 methylated squalenes from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 65:3159–3165. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.09.015

Acién FG, Fernández JM, Magán JJ, Molina E (2012) Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnol Adv 30:1344–1353. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005

Al-Ghussain L (2019) Global warming: review on driving forces and mitigation. Environ. Prog. Sustainable Energy 38:13–21. https://doi.org/10.1002/ep.13041

Al-Hothaly KA, Taha M, May BH, Stylianou S, Ball AS, Adetutu EM (2016) The effect of nutrients and environmental conditions on biomass and oil production in *Botryococcus braunii* Race B strains. Eur J Phycol 51:1–10. https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1071875

Amini Khoeyi Z, Seyfabadi J, Ramezanpour Z (2012) Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. Aquaculture International 20:41–49. https://doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1

An JY, Sim SJ, Kim BW, Lee JS (2004) Improvement of hydrocarbon recovery by two-stage cell-recycle extraction in the cultivation of *Botryococcus braunii*. J Microbiol Biotechnol:932–937

Ano A, Funahashi H, Nakao K, Nishizawa Y (1999) Effect of glycine on 5-aminolevulinic acid biosynthesis in heterotrophic culture of *Chlorella regularis* YA-603. J Biosci Bioeng 88:57–60. https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80176-5

Araújo R, Vázquez Calderón F, Sánchez López J, Azevedo IC, Bruhn A, Fluch S, Garcia Tasende M, Ghaderiardakani F, Ilmjärv T, Laurans M, Mac Monagail M, Mangini S, Peteiro C, Rebours C, Stefansson T, Ullmann J (2021) Current status of the algae production industry in europe: An emerging sector of the blue bioeconomy. Front Mar Sci 7. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389

Arif M, Bai Y, Usman M, Jalalah M, Harraz FA, Al-Assiri MS, Li X, Salama E-S, Zhang C (2020) Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: Role of lipidomics. Bioresour Technol 298:122299. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122299

Avagyan AB (2010) New design of biopharmaceuticals through the use of microalgae addressed to global geopolitical and economic changes. Are you ready for new development in biopharma? PP 01:33–38. https://doi.org/10.4236/pp.2010.11005

Aziz MMA, Kassim KA, Shokravi Z, Jakarni FM, Liu HY, Zaini N, Tan LS, Islam AS, Shokravi H (2020) Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. Renewable Sustainable Energy Rev 119:109621. https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621

Baba M, Kikuta F, Suzuki I, Watanabe MM, Shiraiwa Y (2012) Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. Bioresour Technol 109:266–270. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059

Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2002) *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Crit Rev Biotechnol 22:245–279. https://doi.org/10.1080/07388550290789513

Barolo L, Abbriano RM, Commault AS, George J, Kahlke T, Fabris M, Padula MP, Lopez A, Ralph PJ, Pernice M (2020) Perspectives for glyco-engineering of recombinant biopharmaceuticals from microalgae. Cells 9. https://doi.org/10.3390/cells9030633

Beer S, Vilenkin B, Weil A, Veste M, Susel L, Eshel A (1998) Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. Mar. Ecol. Prog. Ser. 174:293–300. https://doi.org/10.3354/meps174293

Behr A, Agar DW, Jörissen J (2010) Einführung in die Technische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, Wit P de, Sánchez-García M, Ebersberger I, Sousa F de, Amend AS, Jumpponen A, Unterseher M, Kristiansson E, Abarenkov K, Bertrand YJK, Sanli K, Eriksson KM, Vik U, Veldre V, Nilsson RH (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. Methods Ecol Evol. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073

Berkaloff C, Casadevall E, Largeau C, Peracca MS, Virlet J (1983) The resistant polymer of the walls of the hydrocarbon-rich alga *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 22:389–397. https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83010-6

Bermejo E, Muñoz Á, Ramos-Merchante A, Vílchez C, Garbayo I, Cuaresma M (2020) Medium optimisation as a first step towards the feasible production of biopolymers with *Botryococcus braunii*. J Appl Phycol 32:3667–3678. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02245-7

Bhadana B, Tyagi RD (2019) Milking of lipids from oleaginous microorganisms. In: Tyagi RD, Surampalli RY, Zhang TC, Yan S, Zhang X (eds) Biodiesel Production: Technologies, challenges, and future prospects. American Society of Civil Engineers, Reston, VA, pp 383–396

Bippes M, Brauer T, Brück T, Buchholz R, Cotta F, Friedl T, Griehl C, Griesbeck C, Heckenberger U, Michels J, Mostertz M, Muffler K, Müller-Rees C, Posten C, Ripplinger P, Schmidt K, Stute S, Trösch W, Verseck S (2016) Mikroalgen-Biotechnologie: Gegenwärtiger Stand, Herausforderungen, Ziele

Blagg BSJ, Jarstfer MB, Rogers DH, Poulter CD (2002) Recombinant squalene synthase. A mechanism for the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. J Am Chem Soc 124:8846–8853. https://doi.org/10.1021/ja020411a

Blifernez-Klassen O, Chaudhari S, Klassen V, Wördenweber R, Steffens T, Cholewa D, Niehaus K, Kalinowski J, Kruse O (2018) Metabolic survey of *Botryococcus braunii*: Impact of the physiological state on product formation. PLOS ONE 13:e0198976. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198976

Boer K de, Moheimani NR, Borowitzka MA, Bahri PA (2012) Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption. J Appl Phycol 24:1681–1698. https://doi.org/10.1007/s10811-012-9835-z

Borowitzka M (2018a) Commercial-scale production of microalgae for bioproducts. In: La Barre S, S. Bates S (eds) Blue Biotechnology: Production and use of marine molecules. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 33–65

Borowitzka MA (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J Appl Phycol 7:3–15. https://doi.org/10.1007/BF00003544

Borowitzka MA (2013) High-value products from microalgae - their development and commercialisation. J Appl Phycol 25:743–756. https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9

Borowitzka MA (2018b) Biology of Microalgae. In: Levine IA, Fleurence J (eds) Microalgae in Health and Disease Prevention. Academic Press; Elsevier, London, pp 23–72

Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (2016) The Physiology of Microalgae. Springer International Publishing, Cham

Borowitzka MA, Moheimani NR (2013) Sustainable biofuels from algae. Mitigation Adapt Strategies Global Change 18:13–25. https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9

Browne DR, Jenkins J, Schmutz J, Shu S, Barry K, Grimwood J, Chiniquy J, Sharma A, Niehaus TD, Weiss TL, Koppisch AT, Fox DT, Dhungana S, Okada S, Chappell J, Devarenne TP (2017) Draft nuclear genome sequence of the liquid hydrocarbon-accumulating green microalga *Botryococcus braunii* Race B (Showa). Genome Announc 5. https://doi.org/10.1128/genomeA.00215-17

Buchheim MA, Keller A, Koetschan C, Förster F, Merget B, Wolf M (2011) Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: Towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. PLoS One 6:e16931. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016931

Carle R, Schweiggert RM (2016) Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial applications for improving food color. Woodhead Publishing series in food science, technology, and nutrition, number 295. Elsevier Science, Duxford, UK

Casadevall E, Dif D, Largeau C, Gudin C, Chaumont D, Desanti O (1985) Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. Biotechnol. Bioeng. 27:286–295. https://doi.org/10.1002/bit.260270312

Catarina A, Xavier F (2012) Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. In: Muchlisin Z (ed) Aquaculture. InTech

Challouf R, Trabelsi L, Ben Dhieb R, El Abed O, Yahia A, Ghozzi K, Ben Ammar J, Omran H, Ben Ouada H (2011) Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. Brazilian Archives of Biology and Technology 54:831–838

Chaudhari S (2018) Systematic metabolic characterization of hydrocarbon and exo-polysaccharide producing microalga *Botryococcus braunii*. Dissertation, Universität Bielefeld

Chaudry S, Bahri PA, Moheimani NR (2018) Techno-economic analysis of milking of *Botryococcus braunii* for renewable hydrocarbon production. Algal Res 31:194–203. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.011

Chen B, You W, Huang J, Yu Y, Chen W (2010a) Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. World J Microbiol Biotechnol 26:833–840. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0240-y

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010b) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS One 5:e8613. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613

Cheng P, Wang Y, Yang Q, Liu T (2017) Comparison of growth, hydrocarbon accumulation and metabolites of *Botryococcus braunii* between attached cultivation and aqueous-suspension cultivation. Int J Agric Biol Eng 10:134–141. https://doi.org/10.25165/ijabe.v10i1.3008

Cheng P, Zhou C, Wang Y, Xu Z, Xu J, Zhou D, Zhang Y, Wu H, Zhang X, Liu T, Tang M, Yang Q, Yan X, Fan J (2018) Comparative transcriptome analyses of oleaginous *Botryococcus braunii* race A reveal significant differences in gene expression upon cobalt enrichment. Biotechnol Biofuels 11:333. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1331-5

Chisti Y (2020) Microalgae biotechnology: A brief introduction. In: Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Elsevier, pp 3–23

Choi SP, Bahn S-H, Sim SJ (2013) Improvement of hydrocarbon recovery by spouting solvent into culture of *Botryococcus braunii*. Bioprocess Biosyst Eng 36:1977–1985. https://doi.org/10.1007/s00449-013-0974-7

Choudhary K, Verma AK, Swaroop S, Agrawal N (2015) A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region. Helminthologia 52:167–187. https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0031

Coleman AW (2000) The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. Protist 151:1–9. https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002

Coleman AW (2009) Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. Mol Phylogenet Evol 50:197–203. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008

Darienko T, Gustavs L, Eggert A, Wolf W, Pröschold T (2015) Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. PLoS One 10:e0127838. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127838

Davidi L, Katz A, Pick U (2012) Characterization of major lipid droplet proteins from *Dunaliella*. Planta 236:19–33. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1585-7

Dayananda C, Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar GA (2005) Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. Process Biochem 40:3125–3131. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.006

Dayananda C, Sarada R, Usharani M, Shamala T, Ravishankar G (2007) Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. Biomass Bioenergy 31:87–93. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.05.001

Decho AW, Gutierrez T (2017) Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. Front Microbiol 8:922. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00922

Delbarre-Ladrat C, Sinquin C, Lebellenger L, Zykwinska A, Colliec-Jouault S (2014) Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. Front Chem 2:85. https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00085

Deviram G, Mathimani T, Anto S, Ahamed TS, Ananth DA, Pugazhendhi A (2020) Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. J Cleaner Prod 253:119770. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119770

Dosio A, Mentaschi L, Fischer EM, Wyser K (2018) Extreme heat waves under 1.5 °C and 2 °C global warming. Environ Res Lett 13:54006. https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab827

Dudoladova MV, Kupriyanova EV, Markelova AG, Sinetova MP, Allakhverdiev SI, Pronina NA (2007) The thylakoid carbonic anhydrase associated with photosystem II is the component of inorganic carbon accumulating system in cells of halo- and alkaliphilic cyanobacterium *Rhabdoderma lineare*. Biochim Biophys Acta 1767:616–623. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.12.006

Dvir I, Chayoth R, Sod-Moriah U, Shany S, Nyska A, Stark AH, Madar Z, Arad SM (2000) Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. Br J Nutr 84:469–476

Dvir I, Stark AH, Chayoth R, Madar Z, Arad SM (2009) Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats. Nutrients 1:156–167. https://doi.org/10.3390/nu1020156

Enzing C, Ploeg M, Barbosa M, Sijtsma L (2014) Microalgae-based products for the food and feed sector: An outlook for Europe. EUR, Scientific and technical research series, vol 26255. Publications Office, Luxembourg

Eroglu E, Okada S, Melis A (2011) Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. J Appl Phycol 23:763–775. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9577-8

Fernández FGA, Reis A, Wijffels RH, Barbosa M, Verdelho V, Llamas B (2021) The role of microalgae in the bioeconomy. N Biotechnol 61:99–107. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011

Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8:623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Foflonker F, Mollegard D, Ong M, Yoon HS, Bhattacharya D (2018) Genomic analysis of *Picochlorum s*pecies reveals how microalgae may adapt to variable environments. Mol Biol Evol 35:2702–2711. https://doi.org/10.1093/molbev/msy167

Fon Sing S, Isdepsky A, Borowitzka MA, Moheimani NR (2013) Production of biofuels from microalgae. Mitigation Adapt Strategies Global Change 18:47–72. https://doi.org/10.1007/s11027-011-9294-x

Freire-Nordi CS, Vieira AAH, Nascimento OR (2005) The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. Process Biochem 40:2215–2224. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.003

Frenz J, Largeau C, Casadevall E, Kollerup F, Daugulis AJ (1989) Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*. Biotechnol Bioeng 34:755–762. https://doi.org/10.1002/bit.260340605

Friedl T, Rokitta C (1997) Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. Symbiosis

Friedrich J, Dandekar T, Wolf M, Müller T (2005) ProfDist: a tool for the construction of large phylogenetic trees based on profile distances. Bioinformatics 21:2108–2109. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti289

Furuhashi K, Hasegawa F, Saga K, Kudou S, Okada S, Kaizu Y, Imou K (2016a) Effects of culture medium salinity on the hydrocarbon extractability, growth and morphology of *Botryococcus braunii*. Biomass Bioenergy 91:83–90. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.007

Furuhashi K, Noguchi T, Okada S, Hasegawa F, Kaizu Y, Imou K (2016b) The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of extraction solvents into the colony interior. Algal Res 16:160–166. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.021

Gani P, Hua AK, Sunar NM, Matias-Peralta HM, Apandi N (2021) The influence of photoperiod, light intensity, temperature and salinity on the growth rate and biomass productivity of *Botryococcus* sp. IOP Conf Ser.: Earth Environ Sci 646:12006. https://doi.org/10.1088/1755-1315/646/1/012006

García-Cubero R, Cabanelas ITD, Sijtsma L, Kleinegris DM, Barbosa MJ (2018) Production of exopolysaccharide by *Botryococcus braunii* CCALA 778 under laboratory simulated mediterranean climate conditions. Algal Res 29:330–336. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.003

Ge Y, Liu J, Tian G (2011) Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO2 concentration in photobioreactor. Bioresour Technol 102:130–134. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.051

Glembin P (2018) Development of an in situ extraction process of fatty acids from microalgae cultures. DoctoralThesis, TUHH Universitätsbibliothek

Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M (2016) Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. Bioresour Technol 200:279–286. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.023

Gouveia JD, Lian J, Steinert G, Smidt H, Sipkema D, Wijffels RH, Barbosa MJ (2019) Associated bacteria of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). PeerJ 7:e6610. https://doi.org/10.7717/peerj.6610

Gouveia JD, Ruiz J, van den Broek LAM, Hesselink T, Peters S, Kleinegris DMM, Smith AG, van der Veen D, Barbosa MJ, Wijffels RH (2017) *Botryococcus braunii* strains compared for biomass productivity, hydrocarbon and carbohydrate content. J Biotechnol 248:77–86. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.008

Grandgirard J, Poinsot D, Krespi L, Nenon J-P, Cortesero A-M (2002) Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: does host size matter? Entomol Exp Appl 103:239–248. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00982.x

Griehl C (2021) Algenwirkstoffe im Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelbereich, Köthen

Griehl C, Bieler S (2011) Algen: Rohstoffe für Gesundheit, Schönheit und Energie. Nachr. Chem. 59:942–947. https://doi.org/10.1002/nadc.201190063

Griehl C, Kleinert C (2014) Verfahren und Vorrichtung zur Abtrennung von extrazellulären Lipiden aus Algen(DE102014005372A1). https://patentimages.storage.googleapis.com/14/84/89/3bd0db75f389b1/DE102014005372A1.pdf

Griehl C, Kleinert C, Griehl C, Bieler S (2015) Design of a continuous milking bioreactor for non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii*. J Appl Phycol 27:1833–1843. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0472-6

Guckert JB, White DC (1988) Evaluation of a hexane/isopropanol lipid solvent system for analysis of bacterial analysis of bacterial phospholipids and application to chloroform-soluble Nuclepore (polycarbonate) membranes with retained bacteria. J Microbiol Methods 8:131–137. https://doi.org/10.1016/0167-7012(88)90014-0

Guldhe A, Singh B, Rawat I, Ramluckan K, Bux F (2014) Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. Fuel 128:46–52. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059

Guzmán S, Gato A, Lamela M, Freire-Garabal M, Calleja JM (2003) Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. Phytother Res 17:665–670. https://doi.org/10.1002/ptr.1227

Hallmann A, Rampelotto PH (2019) Grand Challenges in Algae Biotechnology. Springer International Publishing, Cham

Han P, Sun Y, Wu X, Yuan Y, Dai Y, Jia S (2014) Emulsifying, flocculating, and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. Appl Biochem Biotechnol 172:36–49. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0505-7

Harwood JL, Jones AL (1989) Lipid Metabolism in Algae. In: Callow JA (ed) Advances in Botanical Research, vol 16. Academic Press, pp 1–53

Hegedűs A, Mocan A, Barbu-Tudoran L, Coman C, Dragoș N (2016) Molecular phylogeny of *Botryococcus braunii* strains (race A) – An integrative approach. Algal Research 19:189–197. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.012

Hejazi MA, Kleinegris D, Wijffels RH (2004a) Mechanism of extraction of beta-carotene from microalga *Dunaliellea salina* in two-phase bioreactors. Biotechnol Bioeng 88:593–600. https://doi.org/10.1002/bit.20238

Hejazi MA, Holwerda E, Wijffels RH (2004b) Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in two-phase bioreactors. Biotechnol Bioeng 85:475–481. https://doi.org/10.1002/bit.10914

Hejazi MA, Wijffels RH (2004) Milking of microalgae. Trends Biotechnol 22:189–194. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.009

Helms G, Friedl T, Rambold G, Mayrhofer H (2001) Identification of Photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. Lichenologist (Lond) 33:73–86. https://doi.org/10.1006/lich.2000.0298

Hepler PK (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. The Plant Cell 17:2142–2155. https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508

Hirano K, Hara T, Ardianor, Nugroho RA, Segah H, Takayama N, Sulmin G, Komai Y, Okada S, Kawamura K (2019) Detection of the oil-producing microalga *Botryococcus braunii* in natural freshwater environments by targeting the hydrocarbon biosynthesis gene SSL-3. Sci Rep 9:16974. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53619-y

Hirose M, Mukaida F, Okada S, Noguchi T (2013) Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (race A). Eukaryot Cell 12:1132–1141. https://doi.org/10.1128/EC.00088-13

Hirsch AM, Fang Y, Asad S, Kapulnik Y (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. Plant Soil 194:171–184. https://doi.org/10.1023/A:1004292020902

Hoeniges J, Kandilian R, Zhang C, Pruvost J, Legrand J, Grizeau D, Pilon L (2020) Effect of colony formation on light absorption by *Botryococcus braunii*. Algal Res 50:101985. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101985

Hopkinson BM, Meile C, Shen C (2013) Quantification of extracellular carbonic anhydrase activity in two marine diatoms and investigation of its role. Plant Physiol 162:1142–1152. https://doi.org/10.1104/pp.113.217737

Hoshina R (2014) DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. BMC Res Notes 7:592. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-592

Hou L, Park H, Okada S, Ohama T (2014) Release of single cells from the colonial oil-producing alga *Botryococcus braunii* by chemical treatments. Protoplasma 251:191–199. https://doi.org/10.1007/s00709-013-0537-4

Hu Z, Min A., Duan S, Ning X, Kaifeng S, Xiaojuan L, Aifen L, Chengwu Z (2009) Effects of nitrogen sources on the growth, contents of total lipids and total hydrocarbons of *Botryococcus braunii*. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica 29:3288–3294

Huang Z, Dale Poulter C (1989) Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. showa. Phytochemistry 28:1467–1470. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97766-5

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754–755. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754

Ishihara M, Shiroma T, Taira T, Tawata S (2006) Purification and characterization of extracellular cysteine protease inhibitor, ECPI-2, from *Chlorella* sp. J Biosci Bioeng 101:166–171. https://doi.org/10.1263/jbb.101.166

Jackson BA, Bahri PA, Moheimani NR (2017) Repetitive non-destructive milking of hydrocarbons from *Botryococcus braunii*. Renewable Sustainable Energy Rev 79:1229–1240. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.130

Jackson BA, Bahri PA, Moheimani NR (2018) Shear Tolerance and Lipid Content of *Botryococcus braunii* During and Post Non-Destructive Solvent Extraction. In: Eden MR, Ierapetritou MG, Towler GP (eds) Computer Aided Chemical Engineering : 13 International Symposium on Process Systems Engineering (PSE 2018), vol 44. Elsevier, pp 1735–1740

Jackson BA, Bahri PA, Moheimani NR (2019) Repetitive extraction of botryococcene from *Botryococcus braunii*: a study of the effects of different solvents and operating conditions. J Appl Phycol 31:3491–3501. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01883-w

Jackson BA, Bahri PA, Moheimani NR (2020) Non-destructive extraction of lipids from *Botryococcus braunii* and its potential to reduce pond area and nutrient costs. Algal Res 47:101833. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101833

Jin J, Dupré C, Yoneda K, Watanabe MM, Legrand J, Grizeau D (2016) Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuels production: Recent advances and opportunities. Process Biochem 51:1866–1875. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.026

Joao T, Tiago P, Ricardo M (2017) Evaluation of two Portuguese strains of *Botryococcus braunii* as biofuel feedstock. Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res. 8:20–29. https://doi.org/10.5897/IJBMBR2017.0274

Kambourova R, Bankova V, Petkov C (2004) Extracellular Lipophilic Substances of Green Alga *Scenedesmus*. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences 57:11

Kambourova R, Petkov G, Bankova V (2006) Extracellular polar organic substances in cultures of the green alga *Scenedesmus*. Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes 119:155–162. https://doi.org/10.1127/1864-1318/2006/0119-0155

Kaplan D, Christiaen D, Arad SM (1987) Chelating Properties of Extracellular Polysaccharides from *Chlorella* spp. Appl Environ Microbiol 53:2953–2956. https://doi.org/10.1128/aem.53.12.2953-2956.1987

Karseno, Harada K, Bamba T, Dwi S, Mahakhant A, Yoshikawa T, Hirata K (2009) Extracellular phycoerythrin-like protein released by freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* and *Scytonema* sp. Biotechnol Lett 31:999–1003. https://doi.org/10.1007/s10529-009-9964-x

Kawachi M, Tanoi T, Demura M, Kaya K, Watanabe MM (2012) Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. Algal Res 1:114–119. https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.003

Keith KA, Quenelle DC, Sanders S, Conley RC, Kern ER, Prichard MN (2008) Novel Inhibitors of Orthopoxvirus Replication Target Vaccinia Virus P37 Envelope Protein. Antiviral Research 78:A58-A59. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.124

Kellam SJ, Walker JM (1987) An extracellular protease from the alga *Chlorella sphaerkii*. Biochem Soc Trans 15:520–521. https://doi.org/10.1042/bst0150520

Khatri W, Hendrix R, Niehaus T, Chappell J, Curtis WR (2014) Hydrocarbon production in high density *Botryococcus braunii* race B continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 111:493–503. https://doi.org/10.1002/bit.25126

Khoo KS, Chew KW, Yew GY, Leong WH, Chai YH, Show PL, Chen W-H (2020) Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. Bioresour Technol 304:122996. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122996

Kind T, Meissen JK, Yang D, Nocito F, Vaniya A, Cheng Y-S, Vandergheynst JS, Fiehn O (2012) Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms. J Chromatogr A 1244:139–147. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.074

Kleinegris DMM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH (2010) The selectivity of milking of *Dunaliella salina*. Mar Biotechnol (NY) 12:14–23. https://doi.org/10.1007/s10126-009-9195-0

Kleinegris DMM, van Es MA, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH (2011a) Phase toxicity of dodecane on the microalga *Dunaliella salina*. J Appl Phycol 23:949–958. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9615-6

Kleinegris DMM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH (2011b) Two-phase systems: potential for in situ extraction of microalgal products. Biotechnol Adv 29:502–507. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.018

Kleinert C (2014) Kontinuierliche Abtrennung extrazellulärer Lipide der Grünalge *Botryococcus braunii* während der Kultivierung. Masterarbeit, Hochschule Anhalt

Kleinert C, Griehl C (2021) Identification of suitable *Botryococcus braunii* strains for non-destructive in situ hydrocarbon extraction. J Appl Phycol 33:785–798. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02342-7

Koetschan C, Hackl T, Müller T, Wolf M, Förster F, Schultz J (2012) ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies. Mol Phylogenet Evol 63:585–588. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.026

Kojima E, Zhang K (1999) Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. J Biosci Bioeng 87:811–815. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80158-3

Komárek J, Marvan P (1992) Morphological Differences in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). Arch Protistenkd 141:65–100. https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80049-7

Kotelev MS, Novikov AA, Afonin DS, Vinokurov VA (2012) Production of energy-dense biomass of microalgae *Botryococcus braunii* and *Chlorella* in a photobioreactor. Chem Technol Fuels Oils 48:8–12. https://doi.org/10.1007/s10553-012-0328-1

Krzemińska I, Pawlik-Skowrońska B, Trzcińska M, Tys J (2014) Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. Bioprocess Biosyst Eng 37:735–741. https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x

Kumar D, Kastanek P, Adhikary SP (2018) Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application. Current Science 115:234. https://doi.org/10.18520/cs/v115/i2/234-241

Kützing FT (1849) Species algarum. Auctore Friderico Traug. Kützing. F. A. Brockhaus, Lipsiae

Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, Dhamelincourt P (1980) Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 19:1043–1051. https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)83054-8

Li Y, Qin JG (2005) Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. J Appl Phycol 17:551–556. https://doi.org/10.1007/s10811-005-9005-7

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N (2008) Biofuels from microalgae. Biotechnol Progr 24:815–820. https://doi.org/10.1021/bp070371k

Li Y, Moore RB, Qin JG, Scott A, Ball AS (2013) Extractable liquid, its energy and hydrocarbon content in the green alga *Botryococcus braunii*. Biomass Bioenergy 52:103–112. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.002

Li D-W, Balamurugan S, Yang Y-F, Zheng J-W, Huang D, Zou L-G, Yang W-D, Liu J-S, Guan Y, Li H-Y (2019) Transcriptional regulation of microalgae for concurrent lipid overproduction and secretion. Sci Adv 5:eaau3795. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3795

Lide DR (2004) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th edn. CRC Press, Boca Raton

Liu L, Pohnert G, Wei D (2016) Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. Mar Drugs 14. https://doi.org/10.3390/md14100191

Lupi FM, Fernandes HML, Sá-Correia I, Novais JM (1991) Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococus braunii* Kütz. UC 58. J Appl Phycol 3:35–42. https://doi.org/10.1007/BF00003917

Lupi FM, Fernandes H, Tomé MM, Sá-Correia I, Novais JM (1994) Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. Enzyme Microb Technol 16:546–550. https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90116-3

Maršálek B, Zahradníčková H, Hronková M (1992a) Extracellular Abscisic Acid Produced by Cyanobacteria under Salt Stress. J Plant Physiol 139:506–508. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80503-1

Maršálek B, Zahradníčková H, Hronková M (1992b) Extracellular Production of Abscisic Acid by Soil Algae under Salt, Acid or Drought Stress. Zeitschrift für Naturforschung C 47:701–704. https://doi.org/10.1515/znc-1992-9-1011

Matsushima D, Jenke-Kodama H, Sato Y, Fukunaga Y, Sumimoto K, Kuzuyama T, Matsunaga S, Okada S (2012) The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases. Plant Sci 185-186:309–320. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.002

Matthes S (2020) Charakterisierung eines neuartigen tubulären Photobioreaktors – Erarbeitung wesentlicher Einflussparameter und modellgestützte Effizienzbewertung phototrophen Wachstums zur stabilen Langzeitkultivierung unter Freilandbedingungen, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Mazur H, Konop A, Synak R (2001) Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. J Appl Phycol 13:35–42. https://doi.org/10.1023/A:1008199409953

Mehta P, Jackson BA, Nwoba EG, Vadiveloo A, Bahri PA, Mathur AS, Moheimani NR (2019) Continuous non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22. Algal Res 41:101537. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101537

Melis A (2013) Carbon partitioning in photosynthesis. Curr Opin Chem Biol 17:453–456. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.010

Merget B, Koetschan C, Hackl T, Förster F, Dandekar T, Müller T, Schultz J, Wolf M (2012) The ITS2 Database. J Vis Exp. https://doi.org/10.3791/3806

Metzger P, Casadevall E (1987) Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. Tetrahedron Lett 28:3931–3934. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96423-2

Metzger P, Berkaloff C, Casadevall E, Coute A (1985) Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 24:2305–2312. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83032-0

Metzger P, Casadevall E, Coute A (1988) Botryococcene distribution in strains of the green alga *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 27:1383–1388. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80199-7

Metzger P, Allard B, Casadevall E, Berkaloff C, Coute A (1990) Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. J Phycol 26:258–266. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00258.x

Metzger P, Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Appl Microbiol Biotechnol 66:486–496. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z

Metzger P, Rager M-N, Fosse C (2008) Braunicetals: acetals from condensation of macrocyclic aldehydes and terpene diols in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 69:2380–2386. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.004

Mikhailyuk TI, Sluiman HJ, Massalski A, Mudimu O, Demchenko EM, Kondratyuk SY, Friedl T (2008) New Streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). Journal of Phycology 44:1586–1603. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00606.x

Moheimani NR, Cord-Ruwisch R, Raes E, Borowitzka MA (2013a) Non-destructive oil extraction from *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). J Appl Phycol 25:1653–1661. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0012-9

Moheimani NR, Matsuura H, Watanabe MM, Borowitzka MA (2014) Non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22 (race B). J Appl Phycol 26:1453–1463. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0179-0

Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Sing SF (2013b) Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) Algae for Biofuels and Energy. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 265–284

Molnár I, Lopez D, Wisecaver JH, Devarenne TP, Weiss TL, Pellegrini M, Hackett JD (2012) Bio-crude transcriptomics: gene discovery and metabolic network reconstruction for the biosynthesis of the terpenome of the hydrocarbon oil-producing green alga, *Botryococcus braunii* race B (Showa). BMC Genomics 13:576. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-576

Mona S, Kaushik A (2015) Chromium and cobalt sequestration using exopolysaccharides produced by freshwater cyanobacterium *Nostoc linckia*. Ecol Eng 82:121–125. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.037

Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfennig A (2000) Liquid-Liquid Extraction. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany

Müller T, Rahmann S, Dandekar T, Wolf M (2004) Accurate and robust phylogeny estimation based on profile distances: a study of the Chlorophyceae (Chlorophyta). BMC Evol Biol 4:20. https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-20

Müller T, Philippi N, Dandekar T, Schultz J, Wolf M (2007) Distinguishing species. RNA 13:1469–1472. https://doi.org/10.1261/rna.617107

Münkel R, Schmid-Staiger U, Werner A, Hirth T (2013) Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. Biotechnol Bioeng 110:2882–2893. https://doi.org/10.1002/bit.24948

Musters W, Boon K, van der Sande CA, van Heerikhuizen H, Planta RJ (1990) Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. The EMBO Journal 9:3989–3996. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07620.x

Niehaus TD, Okada S, Devarenne TP, Watt DS, Sviripa V, Chappell J (2011) Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. PNAS 108:12260–12265. https://doi.org/10.1073/pnas.1106222108

NOAA (2021) State of the Climate: Global Climate Report for October 2021. https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/202110

Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, Pradelles R, Wasiolek V, Sassi J-F (2019) Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. Mar Drugs 17. https://doi.org/10.3390/md17110640

Olaizola M, Grewe C (2019) Commercial Microalgal Cultivation Systems. In: Hallmann A, Rampelotto PH (eds) Grand Challenges in Algae Biotechnology. Springer International Publishing, Cham, pp 3–34

Osório C, Machado S, Peixoto J, Bessada S, Pimentel FB, C. Alves R, Oliveira MBPP (2020) Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. Separations 7:33. https://doi.org/10.3390/separations7020033

Panis G, Carreon JR (2016) Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. Algal Res 18:175–190. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007

Paul C, Pohnert G (2013) Induction of protease release of the resistant diatom *Chaetoceros didymus* in response to lytic enzymes from an algicidal bacterium. PLoS One 8:e57577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057577

Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, Philippis R de, Tamagnini P (2009) Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. FEMS Microbiol Rev 33:917–941. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00183.x

Pichler G, Stöggl W, Candotto Carniel F, Muggia L, Ametrano CG, Holzinger A, Tretiach M, Kranner I (2020) Abundance and extracellular release of phytohormones in aero-terrestrial microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) as a potential chemical signaling source. J Phycol 56:1295–1307. https://doi.org/10.1111/jpy.13032

Posten C, Feng Chen S (2016) Microalgae Biotechnology, vol 153. Springer International Publishing, Cham

Qin JG, Li Y (2006) Optimization of the growth environment of *Botryococcus braunii s*train CHN 357. J Freshwater Ecol 21:169–176. https://doi.org/10.1080/02705060.2006.9664110

Ranga Rao A, Sarada R, Ravishankar GA (2007) Influence of CO2 on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. J Microbiol Biotechnol 17:414–419

Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. Am Sci 46:230A-221

Rigobello-Masini M, Penteado JCP, Tiba M, Masini JC (2012) Study of photorespiration in marine microalgae through the determination of glycolic acid using hydrophilic interaction liquid chromatography. J Sep Sci 35:20–28. https://doi.org/10.1002/jssc.201100488

Rippka R, Stanier RY, Deruelles J, Herdman M, Waterbury JB (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology 111:1–61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1

Rosales-Mendoza S, Solís-Andrade KI, Márquez-Escobar VA, González-Ortega O, Bañuelos-Hernandez B (2020) Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. Expert Opin Biol Ther 20:751–766. https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643

Rosello Sastre R, Posten C (2010) Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. Chem Ing Tech 82:1925–1939. https://doi.org/10.1002/cite.201000124

Rossi F, Philippis R de (2016) Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis. In: Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (eds) The Physiology of Microalgae. Springer International Publishing, Cham, pp 565–590

Ruangsomboon S (2012) Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. Bioresour Technol 109:261–265. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.025

Ruangsomboon S (2015) Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. Bioresour Technol 191:377–384. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.091

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int Dairy J 12:163–171. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1

Ruff K, Pilhofer T, Mersmann A (1976) Vollständige Durchströmung von Lochböden bei der Fluid-Dispergierung. Chem Ing Tech 48:759–764. https://doi.org/10.1002/cite.330480906

Running JA, Severson DK, Schneider KJ (2002) Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. J Ind Microbiol Biotechnol 29:93–98. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000275

Sakamoto K, Baba M, Suzuki I, Watanabe MM, Shiraiwa Y (2012) Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. Bioresour Technol 110:474–479. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.091

Samorì C, Pezzolesi L, Galletti P, Semeraro M, Tagliavini E (2019) Extraction and milking of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* cultures. Green Chem. 21:3621–3628. https://doi.org/10.1039/C9GC01273G

Schlüter M (2018) Bildung und Bewegung von Tropfen und Blasen in technischen Apparaten. In: Stephan P, Mewes D, Kabelac S, Kind M, Schaber K, Wetzel T (eds) VDI-Wärmeatlas: Fachlicher Träger VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–19

Schmid-Staiger U, Preisner R, Trösch W, Marek P (2009) Kultivierung von Mikroalgen im Photobioreaktor zur stofflichen und energetischen Nutzung. Chem Ing Tech 81:1783–1789. https://doi.org/10.1002/cite.200900079

Schriber CL, Venable ME (2019) The effects of environmental stressors on aggregation in *Parachlorella kessleri*. JEP 10:1657–1676. https://doi.org/10.4236/jep.2019.1012099

Schultz J, Maisel S, Gerlach D, Müller T, Wolf M (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. RNA 11:361–364. https://doi.org/10.1261/rna.7204505

Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Schultz J, Wolf M (2006) 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. BMC Bioinformatics 7:498. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-498

Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Wolf M (2008) Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. BMC Res Notes 1:91. https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-91

Selig C, Wolf M, Müller T, Dandekar T, Schultz J (2008) The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. Nucleic Acids Res 36:D377-80. https://doi.org/10.1093/nar/gkm827

Senge B, Blochwitz R, Bentlin S (2004) Rheologische Stoffkennwerte richtig bestimmen. Deutsche Milchwirtschaft:256–260

Senousy HH, Beakes GW, Hack E (2004) Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxioühyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). Journal of Phycology 40:412–423. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03173.x

Shah MR, Lutzu GA, Alam A, Sarker P, Kabir Chowdhury MA, Parsaeimehr A, Liang Y, Daroch M (2018) Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. J Appl Phycol 30:197–213. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z

Shu Q, Qin L, Yuan Z, Zhu S, Xu J, Xu Z, Feng P, Wang Z (2018) Comparison of dairy wastewater and synthetic medium for biofuels production by microalgae cultivation. Energy Sources Part A 40:751–758. https://doi.org/10.1080/15567036.2014.907847

Sim S-J, An J-Y, Kim B-W (2001) Two-phase extraction culture of *Botryococcus braunii* producing long-chain unsaturated hydrocarbons. Biotechnol Lett 23:201–205. https://doi.org/10.1023/A:1005667522375

Skjånes K, Rebours C, Lindblad P (2013) Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. Crit Rev Biotechnol 33:172–215. https://doi.org/10.3109/07388551.2012.681625

Sproles AE, Fields FJ, Smalley TN, Le CH, Badary A, Mayfield SP (2021) Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. Algal Res 53:102158. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102158

Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Annual review of microbiology 31:225–274. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.001301

Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, Novák O, Maróti G, Ljung K, Turečková V, Strnad M, Ordög V, van Staden J (2014) Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). Plant Physiol Biochem 79:66–76. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.005

Stirk WA, van Staden J (2020) Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. Biotechnol Adv 44:107612. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107612

Sun L, Wang L, Zhou Y (2012) Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. Carbohydr Polym 87:1206–1210. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.097

Suzuki R, Ito N, Uno Y, Nishii I, Kagiwada S, Okada S, Noguchi T (2013) Transformation of lipid bodies related to hydrocarbon accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (Race B). PLoS One 8:e81626. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081626

Suzuki R, Nishii I, Okada S, Noguchi T (2018) 3D reconstruction of endoplasmic reticulum in a hydrocarbon-secreting green alga, *Botryococcus braunii* (Race B). Planta 247:663–677. https://doi.org/10.1007/s00425-017-2811-8

Talukder MMR, Das P, Wu JC (2012) Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. Biochem Eng J 68:109–113. https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.001

Tambiev AH, Shelyastina NN, Kirikova NN (1989) Exometabolites of lipid nature from two species of marine microalgae. Funct Ecol 3:245. https://doi.org/10.2307/2389307

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol Biol Evol 38:3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Tanoi T, Kawachi M, Watanabe MM (2014) Iron and glucose effects on the morphology of *Botryococcus braunii* with assumption on the colony formation variability. J Appl Phycol 26:1–8. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0026-3

Templier J, Largeau C, Casadevall E (1984) Mechanism of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 23:1017–1028. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82602-3

Templier L, Largeau C, Casadevall E (1987) Effect of various inhibitors on biosynthesis of non-isoprenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 26:377–383. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81418-1

Thapa HR, Naik MT, Okada S, Takada K, Molnár I, Xu Y, Devarenne TP (2016) A squalene synthase-like enzyme initiates production of tetraterpenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii* Race L. Nat Commun 7:11198. https://doi.org/10.1038/ncomms11198

Tjørve KMC, Tjørve E (2017) The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. PLOS ONE 12:e0178691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691

Tran H-L, Kwon J-S, Kim Z-H, Oh Y, Lee C-G (2010) Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Botryococcus braunii* LB572. Biotechnol Bioprocess Eng 15:277–284. https://doi.org/10.1007/s12257-009-0127-7

Tsutsumi S, Saito Y, Matsushita Y, Aoki H (2018a) Measurement of individual cell strength of *Botryococcus braunii* in cell culture. J Appl Phycol 30:2287–2296. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1466-6

Tsutsumi S, Saito Y, Matsushita Y, Aoki H (2018b) Prediction of hydrocarbon yield from wet *Botryococcus braunii*: The influences of colony surface charge and diameter on the amount of extractable hydrocarbon. Fuel Process Technol 176:50–58. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.03.013

Uno Y, Nishii I, Kagiwada S, Noguchi T (2015) Colony sheath formation is accompanied by shell formation and release in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B). Algal Res 8:214–223. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.015

Veeramuthu A, Ngamcharussrivichai C (2021) Potential of Microalgal Biodiesel: Challenges and Applications. In: Taner T, Tiwari A, Selim Ustun T (eds) Renewable Energy - Technologies and Applications. IntechOpen

Vinayak V, Manoylov KM, Gateau H, Blanckaert V, Hérault J, Pencréac'h G, Marchand J, Gordon R, Schoefs B (2015) Diatom milking: A review and new approaches. Mar Drugs 13:2629–2665. https://doi.org/10.3390/md13052629

Voit H, Zeppenfeld R, Mersmann A (1987) Calculation of primary bubble volume in gravitational and centrifugal fields. Chem. Eng. Technol. 10:99–103. https://doi.org/10.1002/ceat.270100113

Volkman JK (2014) Acyclic isoprenoid biomarkers and evolution of biosynthetic pathways in green microalgae of the genus *Botryococcus*. Org Geochem 75:36–47. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.06.005

Wang ZT, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S, Goodenough U (2009) Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell 8:1856–1868. https://doi.org/10.1128/EC.00272-09

Watanabe MM, Tanabe Y (2013) Biology and industrial potential of *Botryococcus braunii*. In: Richmond A, Hu Q (eds) Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology, 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp 369–387

Weetall HH (1985) Studies on the nutritional requirements of the oil-producing alga *Botryococcus braunii*. Appl Biochem Biotechnol 11:377–391. https://doi.org/10.1007/BF02798671

Weiss TL, Johnston JS, Fujisawa K, Okada S, Devarenne TP (2011) Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. J Appl Phycol 23:833–839. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9586-7

Weiss TL, Roth R, Goodson C, Vitha S, Black I, Azadi P, Rusch J, Holzenburg A, Devarenne TP, Goodenough U (2012) Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. Eukaryot Cell 11:1424–1440. https://doi.org/10.1128/EC.00184-12

Wicker RJ, Kumar G, Khan E, Bhatnagar A (2021) Emergent green technologies for cost-effective valorization of microalgal biomass to renewable fuel products under a biorefinery scheme. Chem Eng J 415:128932. https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128932

Wolf M, Friedrich J, Dandekar T, Müller T (2005a) CBCAnalyzer: Inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures. In Silico Biol 5:291–294

Wolf M, Achtziger M, Schultz J, Dandekar T, Müller T (2005b) Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. RNA 11:1616–1623. https://doi.org/10.1261/rna.2144205

Wolf M, Ruderisch B, Dandekar T, Schultz J, Müller T (2008) ProfDistS: (Profile-) distance based phylogeny on sequence--structure alignments. Bioinformatics 24:2401–2402. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn453

Wolf FR (1983) *Botryococcus braunii* an unusual hydrocarbon-producing alga. Appl Biochem Biotechnol 8:249–260. https://doi.org/10.1007/BF02778262

Wolf FR, Nonomura AM, Bassham JA (1985) Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). J Phycol 21:388–396. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00388.x

Xiao R, Zheng Y (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. Biotechnol Adv 34:1225–1244. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004

Yoshimura T, Okada S, Honda M (2013) Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO2, salinity, temperature, and irradiance conditions. Bioresour Technol 133:232–239. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.095

Zhang K, Kojima E (1998) Effect of light intensity on colony size of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. J Ferment Bioeng 86:573–576. https://doi.org/10.1016/S0922-338X(99)80009-9

Zhang J, Liu X, Xu Z, Chen H, Yang Y (2008) Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. Int Biodeterior Biodegrad 61:351–356. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.015

Zhang F, Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L, Chen H-L (2011) Screening of biocompatible organic solvents for enhancement of lipid milking from *Nannochloropsis sp*. Process Biochem 46:1934–1941. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.024

Zhang F, Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L, Chen H-L (2013) Application of memberane dispersion for enhanced lipid milking from *Botryococcus braunii* FACHB 357. J Biotechnol 165:22–29. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.010

Zhang J (2013) Culture of *Botryococcus braunii*. Master by Research Thesis, Murdoch University

Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer J-P (2020) Microalgae cultivation systems. In: Yousuf A (ed) Microalgae Cultivation for Biofuels Production. Academic Press, pp 11–29

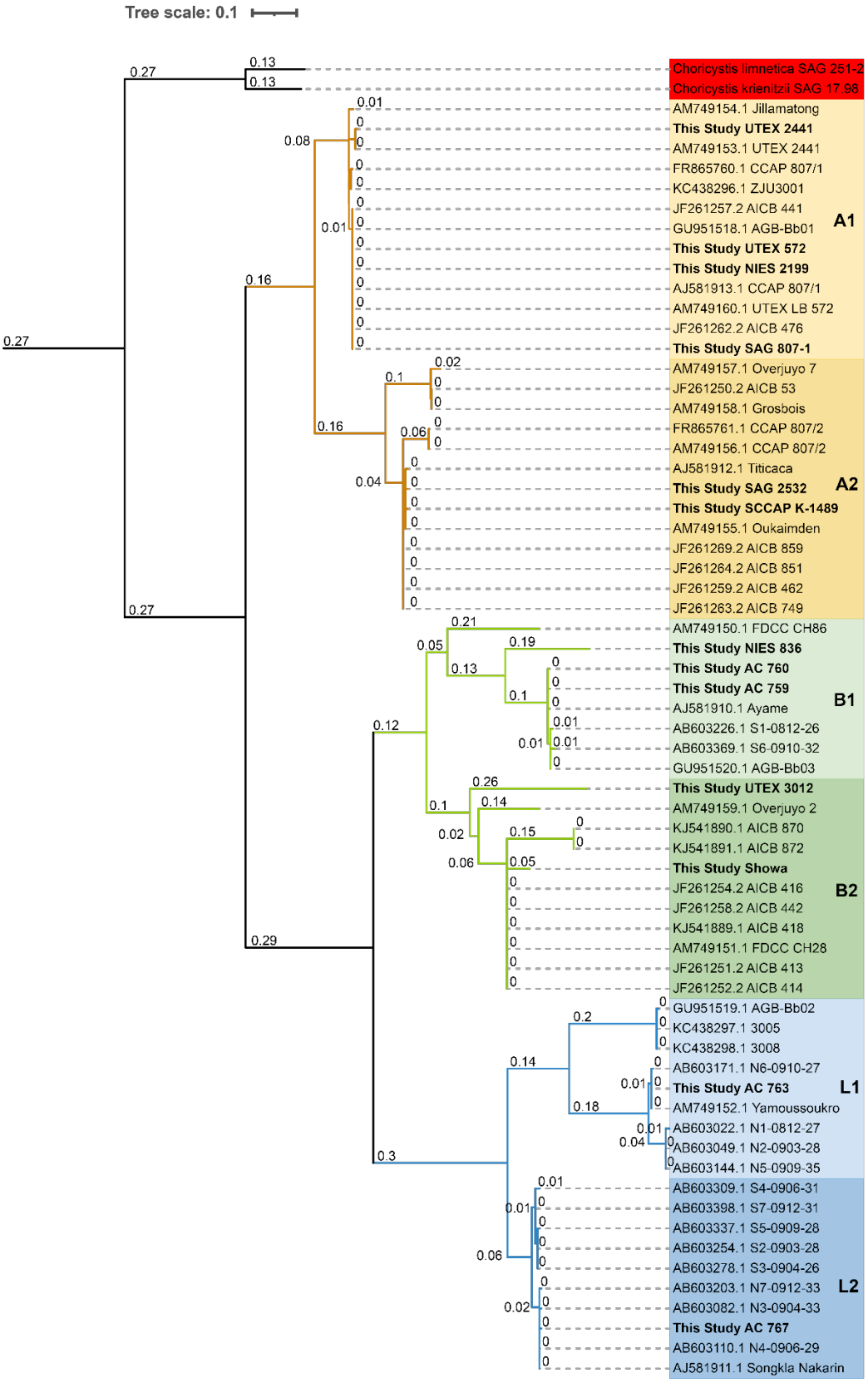
Anhang

Anhang Tabelle 1: Liste der *Botryococcus braunii* Stämme/Isolate mit Zuordnung zu den Races A, B und L für die in dieser Arbeit durchgeführte Betrachtung der ITS2-Region.

Stamm/Isolat	Herkunft der Sequenz	Race	Referenz
CCAP 807/2	This Study	A	Blifernez-Klassen et al. 2018
SAG 807-1	This Study		Cheng et al. 2018
SCCAP K-1489	This Study		
UTEX 572	This Study		
UTEX 2441	This Study		
AICB 441	JF261257.2		
AICB 749	JF261263.2		Gouveia et al. 2019
UTEX 2441	AM749153.1		
UTEX LB 572	AM749160.1		
CCAP 807/1	AJ581913.1		
CCAP 807/1	FR865760.1		
CCAP 807/2	AM749156.1		Blifernez-Klassen et al. 2018
CCAP 807/2	FR865761.1		
Jillamatong	AM749154.1		
ZJU3001	KC438296.1		
Grosbois	AM749158.1		Hegedűs et al. 2016
Overjuyo 7	AM749157.1		
Oukaimden	AM749155.1		
AC 759	This Study	B	Metzger et al. 1988
AC 760	This Study		
Showa	This Study		Browne et al. 2017
AICB 413	JF261251.2		
AICB 414	JF261252.2		
AICB 416	JF261254.2		
AICB 418	KJ541889.1		
AICB 442	JF261258.2		Hegedűs et al. 2016
AICB 870	KJ541890.1		
AICB 872	KJ541891.1		
FDCC CH28	AM749151.1		
FDCC CH86	AM749150.1		
AC 767	This Study	L	(Metzger et al. 1990)
Ayame	AJ581910.1		
Songkla Nakarin	AJ581911.1		
Yamoussoukro	AM749152.1		Hegedűs et al. 2016
3005	KC438297.1		
3008	KC438298.1		

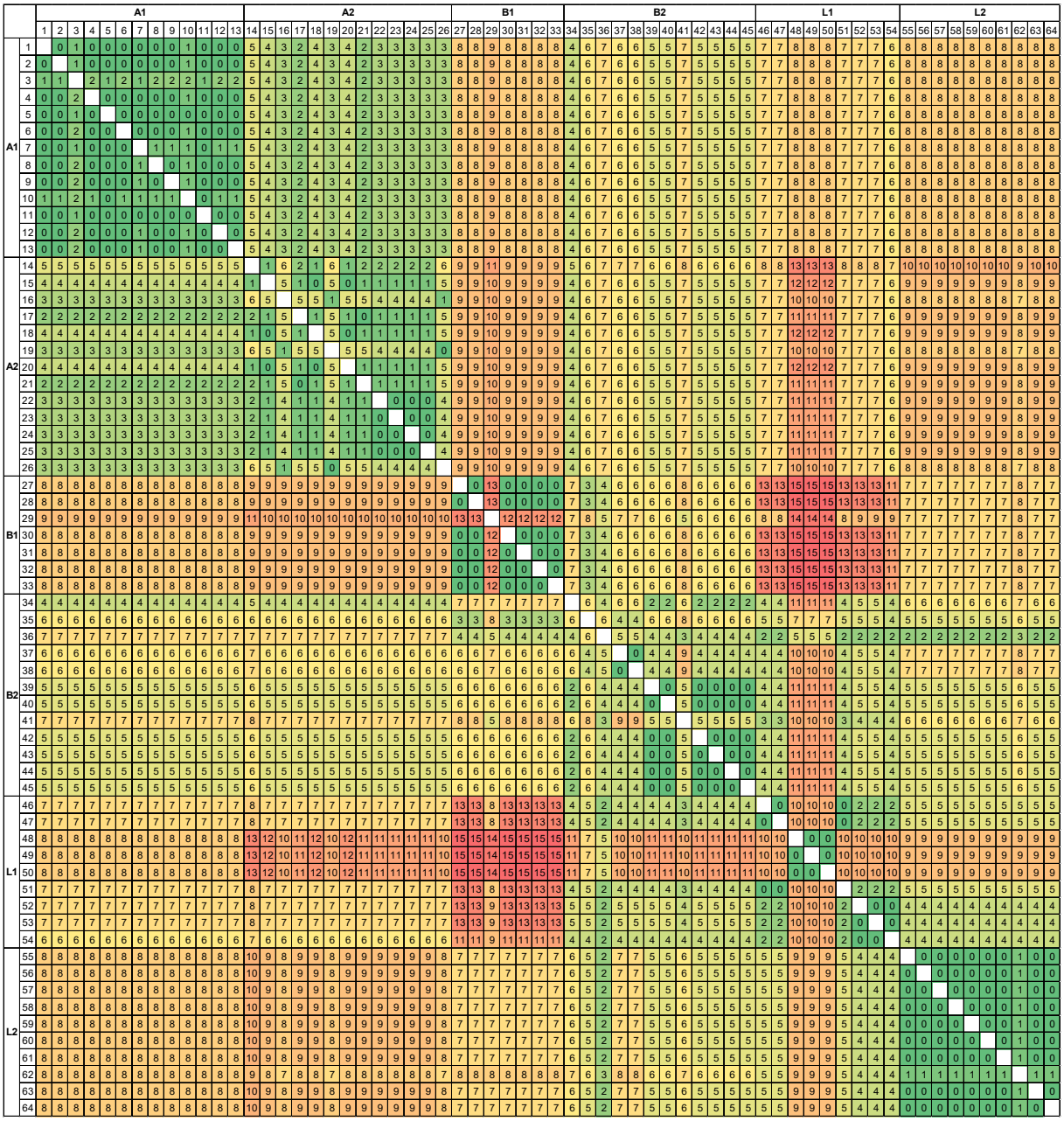
Anhang Tabelle 2: Liste der *Botryococcus braunii* Stämme/Isolate ohne Definition der Race für die in dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Betrachtung der ITS2-Region.

Stamm/Isolat	Herkunft der Sequenz	Race	Referenz
AC 763	This Study		
NIES 836	This Study		
NIES 2199	This Study		
SAG 2532	This Study		
UTEX 3012	This Study		
AGB-Bb01	GU951518.1		
AGB-Bb02	GU951519.1		
AGB-Bb03	GU951520.1		
AICB 53	JF261250.2		
AICB 462	JF261259.2		
AICB 476	JF261262.2		
AICB 851	JF261264.2		
AICB 859	JF261269.2		
N1-0812-27	AB603022.1		
N2-0903-28	AB603049.1	N/A	N/A
N3-0904-33	AB603082.1		
N4-0906-29	AB603110.1		
N5-0909-35	AB603144.1		
N6-0910-27	AB603171.1		
N7-0912-33	AB603203.1		
Overjuyo 2	AM749159.1		
S1-0812-26	AB603226.1		
S2-0903-28	AB603254.1		
S3-0904-26	AB603278.1		
S4-0906-31	AB603309.1		
S5-0909-28	AB603337.1		
S6-0910-32	AB603369.1		
S7-0912-31	AB603398.1		
Titicaca	AJ581912.1		

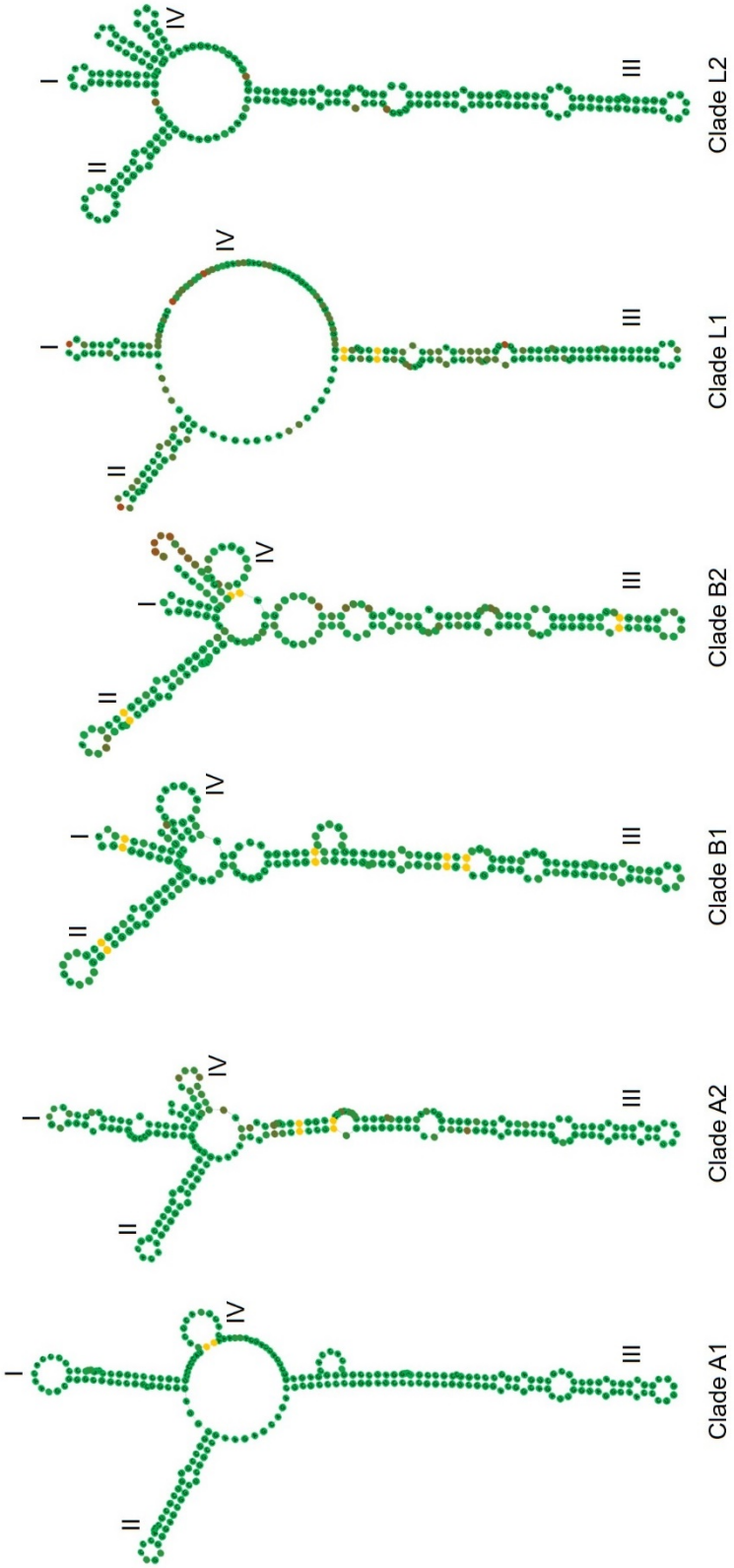


Anhang Abbildung 1: **Phylogenetische Distanzen (Maximum Likelihood; GTR+G+I; 1000 Bootstraps; MEGA11) der primären Struktur der betrachteten *Botryococcus braunii* Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) rRNA Sequenzen (rot: Outgroup; gelb: Race A; grün: Race B; blau: Race L).**

Anhang Abbildung 2: **Darstellung der auftretenden Compensatory Base Changes (CBCs) zwischen den untersuchten *Botryococcus braunii* Stämmen. Darstellung der einzelnen Stämme anhand Laufnummer sortiert in die Clades A1, A2, B1, B2, L1, L2 (1-64 siehe Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4). Farbverlauf von grün (keine CBCs) über gelb zu dunkelrot (6 CBCs).**



Anhang Abbildung 3: **Darstellung der Summe der auftretenden Compensatory Base Changes (CBCs) und hCBCs zwischen den untersuchten *Botryococcus braunii* Stämmen. Darstellung der einzelnen Stämme anhand Laufnummer sortiert in die Clades A1, A2, B1, B2, L1, L2 (1-64 siehe Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4). Farbverlauf von grün (keine CBCs/hCBCs) über gelb zu dunkelrot (15 CBCs/hCBC's).**



Anhang Abbildung 4: **Consensus-Sekundärstruktur der Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Sequenzen der zu dem jeweiligen Clade (A1, A2, B1, B2, L1, L2) gehörigen *Botryococcus braunii* Stämme. Grad der Konservierung von 50 % (braun) zu 100 % (grün). Die Lokalisierung der möglichen CBCs ist in Gelb dargestellt. Helix-Strukturen wurden mit römischen Ziffern (I bis IV) gekennzeichnet.**

Veröffentlichungen mit Bezug zur Dissertation

Peer-Reviewed Fachartikel

2021 Kleinert, C., Griehl, C.
In situ-extraction (milking) of the two promising *Botryococcus braunii* strains Showa and Bot22 under optimized extraction time. Journal of Applied Phycology (2021). https://doi.org/10.1007/s10811-021-02633-7

2021 Kleinert, C., Griehl, C.
Identification of suitable *Botryococcus braunii* strains for non-destructive *in situ* hydrocarbon extraction. Journal of Applied Phycology 33, 785–798 (2021). https://doi.org/10.1007/s10811-020-02342-7

Vorträge

2021 Kleinert, C., Griehl, C.
Milking of *Botryococcus braunii* on a semi-technical scale.
7th Congress of the International Society for Applied Phycology (Online)
14.05.2021 - 13.08.2021

2018 Kleinert, C., Griehl, C.
Entwicklung eines „Milking"-Prozesses zur Extraktion extrazellulärer Algenlipide.
11. Bundesalgenstammtisch 2018, Karlsruhe, 27.09.2018 – 28.09.2018

2018 Kleinert, C., Friedl, T., Griehl, C.
Gewinnung extrazellulärer Lipide aus der Mikroalge *Botryococcus braunii*.
19. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, Köthen, 05.06.2018 – 06.06.2018

Poster

2021 Kleinert, C., Griehl, C.
Scale-up der *in situ*-Extraktion von *Botryococcus braunii* in den semi-technischen Maßstab.
DACH Algen Summit 2021, Wien, 11.10.2021 – 12.10.2021

2020 Kleinert, C. and Griehl, C. (2020), Milking (In-Situ-Extraktion) von Kohlenwasserstoffen während der Kultivierung ausgewählter Mikroalgen. Chemie Ingenieur Technik, 92: 1217-1218. https://doi.org/10.1002/cite.202055101
10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (Online) 21.09.2020 – 24.09.2020

2019 Kleinert, C., Friedl, T., Griehl, C. Investigation of the secretion and extraction of extracellular lipids from microalgae.
Sachsen-Anhalt - Zentrum der Algenbiotechnologie in der Metropolregion, Köthen, 14.05.2019