

## **Optimierung des Verarbeitungsprozesses von Spirulina Algen**

Teilnehmerin/Teilnehmer: Philipp Schöneberg (18) Marta Magin (17)  
Marvin Lemke (18)

Erarbeitungsort: Gymnasium Athenaeum Stade

Projektbetreuerin/Projektbetreuer: Dr. Helmut Schneider

Thema des Projekts:

In unserem Projekt versuchen wir, eine Optimierung des Verarbeitungsprozesses von Spirulina Algen herbeizuführen. Dieser setzt sich aus der Herstellung von blauen Gummibärchen über die Extraktion von Pulverfarbstoff zusammen.

Fachgebiet: Biologie

Wettbewerbssparte: Jugend forscht

Bundesland: Niedersachsen

Wettbewerbsjahr: 2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Vorgehensweise, Materialien und Methoden.....</b>	<b>4</b>
2.1 Materialien: .....	4
2.1.1 Schüttelgerät .....	4
2.1.2 Multikultivator .....	5
2.1.3 Kühler .....	6
2.1.4 Mikroskop .....	6
2.1.5 Sonstiges .....	7
2.2. Vorgehensweise .....	7
2.2.1. Testexperiment: .....	7
2.2.2. Experiment 1: .....	7
2.2.3. Experiment 2: .....	7
2.2.4. Experiment 3: .....	8
2.2.5. Experiment 4 .....	8
2.2.6. Experiment 5 .....	9
2.2.7. Experiment 6 .....	9
2.2.8. Experiment 7 (Soxhletextraktion).....	9
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>11</b>
3.1. Ergebnisse Testexperiment:.....	11
3.2. Ergebnisse Experiment 1: .....	12
3.3. Ergebnisse Experiment 2: .....	13
3.4. Ergebnisse Experiment 3: .....	14
3.5. Ergebnisse Experiment 4: .....	15
3.6. Ergebnisse Experiment 5: .....	15
3.7. Ergebnisse Experiment 6: .....	15
3.8. Ergebnisse Experiment 7 (Soxhletextraktion): .....	15
<b>4. Ergebnisdiskussion .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>16</b>
<b>6. Quellen- und Literaturverzeichnis.....</b>	<b>17</b>
<b>7. Unterstützungsleistungen.....</b>	<b>17</b>

## 1. Einleitung

Unser Projekt handelt davon, Algen auf verschiedene Arten zu kultivieren und die Auswirkungen verschiedener äußerer Einflüsse während der Kultivierung herauszuarbeiten und zu analysieren. Dabei wollten wir zu Beginn besonders den Aspekt der Wasserstoffgewinnung betrachten. In dem Zusammenhang wollten wir überprüfen, wie mögliche Resultate nutzbar gemacht, eine Hilfe sein und angewendet werden könnten. Diese Idee kam uns bei Betrachtung der aktuellen Lage unserer Gesellschaft. Hierbei ist uns der Umstieg von fossilen zu umweltfreundlichen Energieträgern besonders aufgefallen. Als wir uns diesen Umstieg genauer anschauten, fiel auf, dass Strom zwar eine vielversprechende Alternative, aber bei großen Maschinen und Fahrzeugen mit unserer aktuellen Technik noch nicht realisierbar ist. Somit haben wir darüber nachgedacht, welche anderen Möglichkeiten noch existieren, und kamen zu dem Schluss, dass Wasserstoff wohl die Beste sei. So kamen wir dann auf die Wasserstoffproduktion und die verschiedenen Prozesse, in welchen dieser produziert wird. Einer davon, war der durch Algen. Hierbei wird den Algen das Sulfat aus ihrem Nährmedium entzogen, um die Sauerstoffproduktion zu vermindern und die Wasserstoffproduktion anzuregen (Melis *et al.* 2000; Ghirardi *et al.* 2000). Dieser Prozess wirkte auf uns wie eine äußerst zukunftsorientierte Lösung für eine grüne Wasserstoffproduktion und wir entwickelten die Idee diesen Prozess zu optimieren. Das soll dazu führen, die Wasserstoffproduktion ökonomischer und zu gleich ökologischer zu machen. Hierdurch hätten wir eine wirkliche Konkurrenz zu fossilen Brennstoffen.

Während der Bearbeitung unseres Projektes zeigte sich jedoch, dass die Wasserstoffgewinnung sowie die Lagerung mit unseren Mitteln nicht realisierbar waren. Als folge dessen stoppten wir unsere Fokussierung auf die Wasserstoffproduktion und entschlossen uns, unsere Bemühungen stattdessen auf die Produktion von natürlichen Lebensmittelfarbstoffen zu legen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass häufig über chemische Farbstoffe diskutiert und debattiert wird sowie aufgrund der Möglichkeit der Analyse eines gesamten Produktionsprozesses, unabhängig vom Produkt, um durch die Durchführung, neue Ansätze für Optimierungen zu finden.

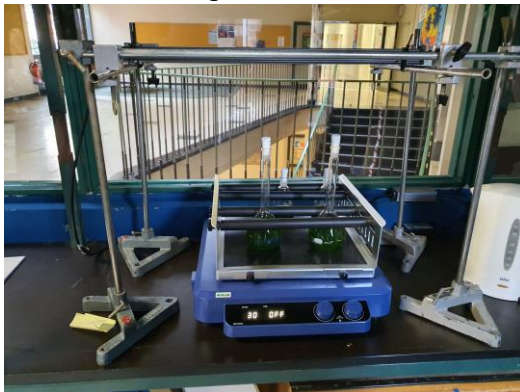
## 2. Vorgehensweise, Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien:

Da wir neu in diesem Fachgebiet waren und keinerlei Vorkenntnisse hatten, war es nötig, uns zu Beginn das nötige Grundwissen anzueignen und uns über mögliche Geräte und Organismen sowie über eine mögliche Vorgehensweise zu informieren. Dazu nahmen wir zum Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der technischen Universität Hamburg Kontakt auf und vereinbarten einen Termin, wo wir die Möglichkeit erhielten, mit Experten auf diesem Fachgebiet zu sprechen und Fragen zu stellen. Des Weiteren durften wir das Labor des Instituts besuchen und uns verschiedene Prozesse anschauen. Nach dem Besuch überlegten wir uns mit den neuen Informationen, welche Alge für unser Projekt und Maschinen zur Kultivierung dieser notwendig und sinnvoll wären. Übergangsweise entschieden wir uns dabei für die Alge *Chlamydomonas Reihardtii*, welche wir aber aufgrund der Änderungen unseres Zielprodukts später durch die Alge *Spirulina* austauschten. Zur Kultivierung der Algen entschieden wir uns für den Kauf eines Laborschüttlers, einer Wachstumslampe, eines Multikultivators, eines dazugehörigen Kühlers sowie eines Mikroskops, da diese Geräte eine hohe Präzision sowie ausreichende Variations- und Platzmöglichkeiten boten.

#### 2.1.1 Schüttelgerät

Als Schüttelgerät wählten wir das „WINLAB Universal – Schüttelgerät“ der Firma „WINLAB“. Dieser dient zusammen mit der darauf angebrachten Wachstumslampe der Algenkultivierung in den ersten zwei von vier Wachstumsphasen, der Lag-Phase und der Log-Phase. Die Lag-Phase beschreibt hierbei den Zeitraum, in welchem sich die Algen an das neue Nährmedium anpassen, indem sie passende Enzyme für die Nährstoffe in ihrer Umgebung ausbilden. In unserem Fall findet diese Phase aufgrund der Überführung der Algen in das TAP-Medium statt. Die zweite Phase, die Log-Phase beschreibt dann die Zeit des exponentiellen Wachstums der Kultur, in welcher diese ihren größten Zuwachs hat. Anschließend folgen noch die Stationäre- sowie Sterbephase, in welchen das Wachstum abnimmt, stagniert und schlussendlich negativ wird (Hans G. Schlegel, Karin Schmidt, 1981). Um die Kultivierung in den ersten zwei Phasen zu gewährleisten, bewegt der Laborschüttler die Abstellfläche kreisförmig mit einer konstanten, festlegbaren Geschwindigkeit. Dadurch werden die Algen in den darauf angebrachten Behältern dauerhaft in Bewegung gehalten (Abb. 1). Außerdem bestrahlt die darüber angebaute Wachstumslampe in einem, durch eine Zeitschaltuhr festgelegten Tag-Nacht-Zyklus (Intervalle: 8 Stunden Licht am Stück) die Algen, um die Kultivierung zusätzlich zu fördern (Abb. 2).



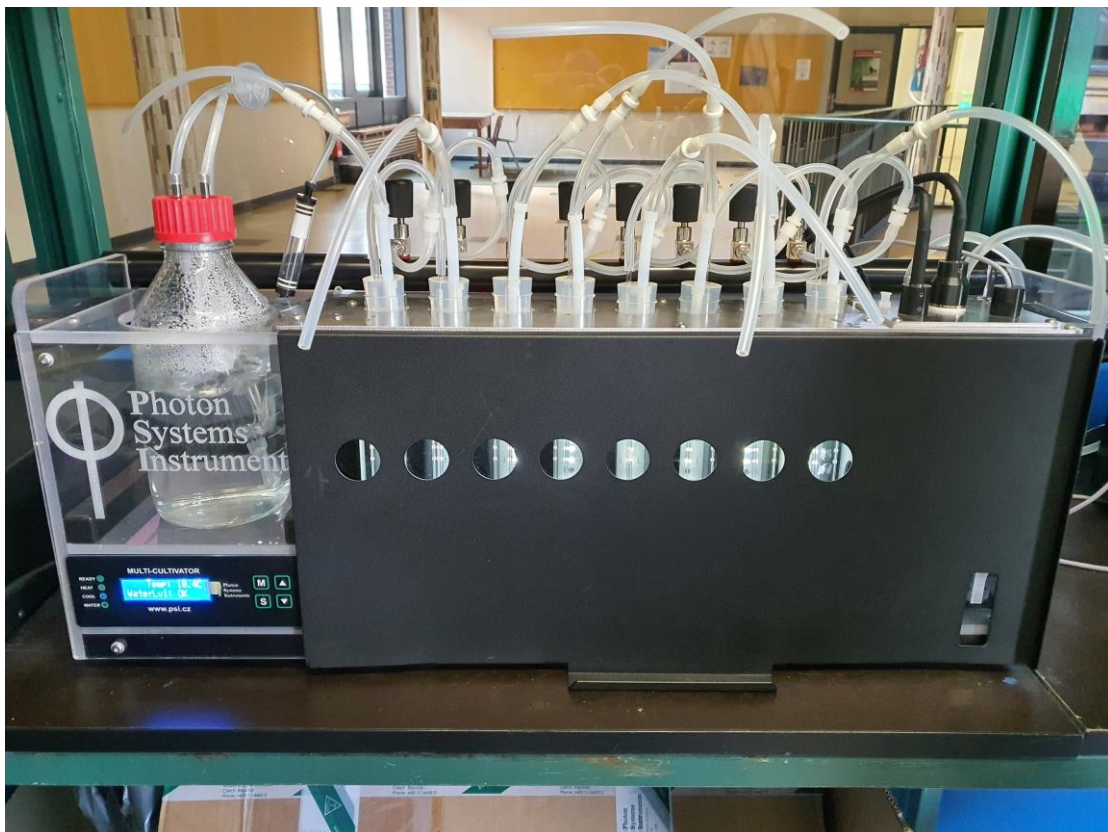
**Abb. 1:** Schüttelgerät samt inaktiver Wachstumslampe



**Abb. 2:** Schüttelgerät samt aktiver Wachstumslampe

## 2.1.2 Multikultivator

Der Multikultivator (Abb. 3) dient daraufhin dem kontrollierten Kultivieren der Algen in der 2. Wachstumsphase. Wir nutzen den „Multi-Cultivator MC 1000-OD“ der Firma „PHOTO SYSTEMS INSTRUMENTS“ in der Standardausführung. Er kann per Hand moduliert oder am Computer gesteuert werden. Da wir möglichst präzise Ergebnisse mit wenig Fehlerquellen erzielen wollen, entschieden wir uns für die digitale Variante. Beim Anschließen des Gerätes kam es allerdings zu dem Problem, dass der Multikultivator vom System nicht erkannt und somit nicht verwendet werden konnte. Nach eingehender Untersuchung des Problems und dem Überprüfen vieler möglichen Fehlerquellen, entdeckten wir den Fehler, welcher durch einen defekten USB-Port verursacht wurde. Um den nun erkannten Multikultivator über den Computer zu steuern, wurde ein Programm mitgeliefert, in welches wir uns daraufhin einarbeiteten. Der Multikultivator besitzt acht weitgehend unabhängige Plätze für Reagenzgläser, welche sich, als einzige Gemeinsamkeit, im selben Wasser befinden, was eine gemeinsame Temperatur zur Folge hat. Diese Temperatur kann mit Hilfe des Kühlers konstant gehalten werden. Weitere auf die Algen wirkende Einflüsse, wie die Lichtintensität können separat kontrolliert werden. Da an diesem Gerät sehr hohe Lichtintensitäten einstellbar sind, war es nötig, Schutzmaßnahmen zu ergreifen, welche wir mit dem extra angebauten Sichtschutz „Protective Front Cover“ derselben Firma (Abb. 3) sowie neuen Schutzbrillen erreichten. Des Weiteren bietet der Multikultivator die Möglichkeit, Messungen, wie die der Algenkonzentration mit Hilfe eines OD Messers für jeden Slot einzeln vorzunehmen. Diese Messgeräte bieten die Möglichkeit die optische Dichte zwei verschiedenen Wellenlängen zu messen. So können die Messungen im Bereich von Wellenlängen der Größe 680 nm oder in einem Bereich von 720 nm stattfinden. Da unsere Algen grün sind und somit besser auf Wellenlängen von 720 nm reagieren, beziehen sich alle nachfolgenden OD Messungen auf diese Wellenlänge und werden nicht weiter unterschieden.





**Abb. 3:** Multikultivator mit Sichtschutz in schwarz sowie manueller Eingabe am Display links unten am Gerät.

## 2.1.3 Kühler

Der von uns zusätzlich genutzte Kühler „AC-710 Cooling Unit Hailea Modelic 130 A“ ebenfalls der Firma „PHOTO SYSTEMS INSTRUMENTS“ (Abb. 4) ist verbunden mit dem Multikultivator und somit auch ansteuerbar über das Computerprogramm. Er sorgt für die Kühlung des Wassers, in welchem sich die Reagenzgläser mit den Proben befinden und somit für die Einhaltung der eingestellten Temperatur.



**Abb. 4:** Kühler

## 2.1.4 Mikroskop

Das Mikroskop (Abb. 5) bietet ähnlich zum Multikultivator die Möglichkeit per Computerprogramm gesteuert zu werden. So ist es möglich, Fotografien und Videos über den Computer aufzunehmen und das aktuelle Geschehen zu betrachten. Es hat den Nutzen, die Algen am Ende des Prozesses zu untersuchen und eventuelle Veränderungen festzustellen. Außerdem wird es zur Überprüfung der Algen genutzt. So kann es bei zu langer Kultivierung der Algen, mit beispielsweise dem Laborschüttler, zum Absterben der Algen in der 3. und 4. Wachstumsphase kommen, was wir durch eine Untersuchung mit dem Mikroskop überprüfen können.



## Abb. 5: Mikroskop

### 2.1.5 Sonstiges

Da unsere Ergebnisse möglichst präzise sein sollen und wir Unreinheiten weitgehend ausschließen wollen, ist es unser Anspruch ein hohes Sterilitätslevel einzuhalten. Hierzu nutzen wir einen schulischen Ofen aus dem Chemietrakt, welcher dem Sterilisieren der Arbeitsmaterialien dient sowie Laborkittel und Handschuhe.

Weitere Arbeitsmaterialien, die wir für unsere Experimente nutzen sind LLG-Zellstoff-Steristopfen der Firma „LLG-Labware“ sowie handelsübliche Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben, Pipetten und Trichter.

### 2.2. Vorgehensweise

#### 2.2.1. Testexperiment:

Als wir alle Geräte angeschlossen hatten, begannen wir ein Testexperiment, welches dem Aneignen der Software des Multikultivators und dem testweisen Ansteuern verschiedener Module diente. So testeten wir die Steuerung der Temperatur und Lichtintensität.

#### 2.2.2. Experiment 1:

Nachdem wir uns nun mit dem Testexperiment das nötige Grundwissen zur Bedienung der Geräte angeeignet hatten, überlegten wir, was wir als unser erstes Experiment wählen sollten. Bei unseren Überlegungen kam uns der Gedanke, dass wir zukünftig unsere Messungen und Ergebnisse mit einem Referenzexperiment vergleichen müssten, um eine Veränderung erkennen zu können. Daher starteten wir unser erstes Experiment als ein solches mit dem Ziel, die Kultivierung der Algen bei aus unserer Sicht gewöhnlichen Wachstumsbedingungen zu testen. Wir kultivierten die Algen zuerst als Lösung im TAP-Medium im Laborschüttler bei einer Geschwindigkeit von 20 Umdrehungen pro Minute. Dieser Prozess dauerte, bis sich genügend Algen gebildet hatten, um acht Proben für den Multikultivator vorbereiten zu können. Als dies der Fall war füllten wir jeweils ungefähr gleich viel Lösung mit Pipetten in die acht Reagenzgläser des Multikultivators. Als möglichst gewöhnliche Werte legten wir für die Temperatur  $17^{\circ}\text{C}$  und für die Lichtintensität bei allen Reagenzgläsern  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fest. Des Weiteren entschieden wir uns, die Luftpumpe während der gesamten Experimentdauer eingeschaltet zu lassen und aktivierten die OD Messungen, welche wir auf ein fünfminütiges Intervall setzten. Für die Experimentdauer legten wir eine Woche fest und starteten daraufhin den Versuch.

Während des Experiments sank das Wasserlevel des Wärmebades unter einen kritischen Wert (Markierung 1 in Abb. 7), weshalb die Kontrolle der Wachstumsbedingungen, bis wir das Problem bemerkten und das Wasser nachfüllten (Markierung 2 in Abb. 7), aussetzte. Dieser Zwischenfall dauerte exakt 7 Stunden und 15 Minuten.

Für das gesamte Experiment nutzten wir noch die Alge *Chlamydomonas Reinhardtii*.

#### 2.2.3. Experiment 2:

Aufgrund der Ergebnisse unseres letzten Experiments entschieden wir uns, ein weiteres Experiment als neuen Referenzversuch aufzusetzen. Das neue Experiment sollte jedoch ohne Unterbrechungen und mit anderen Wachstumsbedingungen ablaufen, um diesmal ein besseres Algenwachstum zu erzielen und eine bessere Referenz zu bilden. Wir begannen wieder damit, genügend Algen im Schüttelgerät bei derselben Geschwindigkeit zu kultivieren und füllten diese danach wieder in die acht Slots des Multikultivators. Bei diesem Experiment entschieden wir uns dazu in jedes Reagenzglas genau eine halbe Pipette Algenlösung aus der Kultivierung mit dem Laborschüttler zu

geben. Das sollte dazu dienen, dass die Proben zu Beginn eine ähnliche Algenkonzentration besitzen. Anschließend richteten wir das Experiment über die Software des Multikultivators ein. Um passendere Werte für die Wachstumsbedingungen zu wählen und ein vielfaches Ausprobieren zu vermeiden, entschieden wir uns vorher beim Hersteller des Multikultivators nach angemessenen Werten zu erkundigen. Diese empfahlen uns dann eine Temperatur von 25 Grad Celsius und eine Lichtintensität von  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nachdem wir diese Parameter übernommen hatten, aktivierten wir wieder die Luftpumpe sowie die Messungen der optischen Dichte bei gleichen Intervallen und gleicher Versuchsdauer.

Bei der Durchführung dieses Experiments achteten wir explizit auf die Höhe des Wasserpegels, um ein Unterschreiten des kritischen Wasserspiegels wie beim letzten Experiment zu vermeiden. Hierzu bestimmten wir einen aus unserer Gruppe, der das Wasser an einem festgelegten Tag nachfüllte. Allerdings kam es während des Experiments an den Markierungen eins bis vier trotzdem zu zwei kurzen Aussetzern des Systems, welche durch das Entbinden des Multikultivators vom Computersystem zustande kamen. Das erste Verbindungsproblem (Markierung 1 bis 2 in Abb. 8) dauerte genau 18 Sekunden, während der zweite Zwischenfall (Markierung 3 bis 4) 6 Sekunden anhielt.

Auch für dieses Experiment nutzten wir noch die Alge *Chlamydomonas Reinhardtii*.

#### 2.2.4. Experiment 3:

Aufgrund der, nach den letzten Ergebnissen, entstandenen Idee eines Referenzexperiments, welches auf OD Werten basiert, starteten wir nach demselben Ablauf wie zuvor ein weiteres Experiment. Jedoch füllten wir nach der Kultivierung durch das Schüttelgerät mit 20 Umdrehungen in der Minute eine Algenkonzentration von einem Zehntel einer Algenlösung mit einer optischen Dichte von 1 in die acht Proben des Multikultivators. Wir richteten dieselben Einstellungen für die Parameter sowie Messungen wie zuvor ein und starteten das Experiment über die gleiche Zeitspanne.

Wie im ersten Experiment sank der Wasserpegel auch in diesem Versuch unter einen kritischen Punkt (Markierung 1 in Abb. 9) und das System stoppte die Kontrolle und Anpassung der Parameter. Nach dem Auffüllen des Wasserspiegels (Markierung 4 in Abb. 9) lief das Experiment jedoch wie geplant weiter. Dieser Zwischenfall hielt 11 Stunden und 23 Minuten an. Währenddessen fand auch eine Trennung des Multikultivators vom System statt (Markierung 2 bis 3 in Abb. 9), welche 1 Stunde, 55 Minuten und 47 Sekunden anhielt.

Genau wie in den zwei vorherigen Experimenten arbeiteten wir hier ebenfalls noch mit der Alge *Chlamydomonas Reinhardtii*.

#### 2.2.5. Experiment 4

Nach der Erstellung eines geeigneten Referenzexperiments (2.2.2. - 2.2.4.), ging es, um eine Optimierung der Masse an gewonnenem Wasserstoff, basierend auf der Kultivierung der Algen. Um dies erreichen zu können, überlegten wir uns zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit besteht darin mehr Algenmasse über den gleichen Zeitraum zu kultivieren, um mit mehr Algen Wasserstoff produzieren zu können. Die zweite Möglichkeit setze bei der Produktivität der Algen an und plante die in einem bestimmten Zeitraum generierte Menge an Wasserstoff von Algen, welche verschieden kultiviert wurden zu vergleichen und herauszufinden, ob eine Veränderung der Kultivierungsbedingungen Einfluss auf die potenzielle Produktivität der Algen hat. Aufgrund dessen, dass allgemein bekannt ist, dass Unterschiede in der Kultivierung unterschiedliche Wachstumsraten zur Folge haben und Möglichkeit zwei auf rein statistischen Vergleichen beruhen würde, entschieden wir uns dazu mit Möglichkeit eins zu starten und



später ebenfalls die zweite zu überprüfen. Zu Beginn der Umsetzung von Variante eins überlegten wir uns wie eine Überprüfung der Masse an kultivierten Algen, nach jedem Kultivierungszyklus aussehen könnte. Als erstes dachten wir darüber nach, nach der Kultivierung der Algen eine Filterung ihrer Lösung vorzunehmen und die gefilterte Masse zu messen, jedoch wäre dies aufgrund der Zeitintensivität und enormen Menge an möglichen, zu testenden Kultivierungsbedingungen sehr ineffizient. Bei weiterer Beratung und Rücksprache mit Herrn Arnold der Technische Universität München entschieden wir uns dazu, eine OD-Masse-Korrelation durchzuführen, um allein am OD-Wert am Ende eines Experimentes auf die Masse schließen und Ergebnisse erzielen zu können. Diese Korrelation führten wir also als nächstes durch, indem wir mit Hilfe unseres Multikultivators den OD-Wert einer Lösung bestimmten und anschließend durchs Filtern dieser die Masse maßen. Hierdurch konnten wir eine Exceltabelle und einen Umrechnungsfaktor bestimmen.

## 2.2.6. Experiment 5

Nachdem nun alle vorbereitenden Experimente erfolgreich vollzogen waren, wollten wir als nächstes die Wasserstoffproduktion testen. Hierzu mischten wir eine Nährlösung nach dem Vorbild des TAP-Mediums an, jedoch ohne Sulfate. Wir überführten die Algen in ihr neues Medium und stellten sie samt einem Magnetrührer unter einen Abzug. Zusätzlich verdunkelten wir ihr Gefäß und versuchten die Algen so und in Kombination mit dem veränderten Medium dazu bringen ihren Stoffwechsel umzustellen und als Stoffwechselprodukt Wasserstoff herzustellen.

## 2.2.7. Experiment 6

Aufgrund des Wechsels der Algensorte, basierend auf den Ergebnissen vom letzten Experiment, war es nun nötig Experiment 3 sowie 4 mit der neuen Alge zu wiederholen. Diese führten wir, derselben Vorgehensweise wie zuvor folgend, durch.

## 2.2.8. Experiment 7 (Soxhletextraktion)

Aufgrund des Zieles der Produktion von natürlichem Lebensmittelfarbstoff und dem den gesamten Produktionsprozess nachzuvollziehen, um nach neuen Optimierungsansätzen zu suchen, war nun der nächste Schritt den blauen Farbstoff Phycocyanin zu gewinnen. Dazu war es nötig, den Farbstoff aus den Algen zu extrahieren. Zu Beginn mussten die Algen aus der Nährlösung entnommen werden. Dazu wurden zunächst die Algen mit Filterpapier aus der Nährlösung getrennt und getrocknet. Dieses Vorgehen erwies sich als ungeeignet, da es langwierig und ineffizient war die Algen mit einem Skalpell vom Filterpapier zu kratzen (Abb. 1).



**Abb. 6:** Prozess des Ablöses der gefilterten Algen vom Filterpapier

Dieses Problem konnte mit einer Wasserstrahlpumpe gelöst werden, da diese mit einem Vakuum sehr schnell Algen und Nährlösung trennt, sodass die Algen zur Farbstoffgewinnung verfügbar wurden (Abb. 2).



**Abb. 7:** Wasserstrahlpumpe

Der nächste Schritt war die Extraktion des Phycocyanin aus den Algen.

Dazu wurde anfangs eine Ultraschallmethode angewendet. Die Algen werden mit einer Säure und Glasperlen in einen Erlenmeyerkolben gefüllt, bevor dieser in ein Ultraschallbad gestellt wird. Diese Methode zeigte sich jedoch nach mehreren Durchführungen als nicht funktionierend. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode verwendet. Es wurde die Soxhletextraktion angewandt. Zudem empfahl die Biologiefachschaft eine Lauge als Lösungsmittel zu verwenden. Die Algen wurden in eine Extraktionshülse aus Zellulose gegeben und in den Soxhletaufsatz getan. Darüber wurde ein Rückflusskühler montiert. Die Lauge wurde verdampft und am Rückflusskühler kondensiert. Die kondensierte Lauge tropft in die Extraktionshülse und löst das Phycocyanin aus den Algen. Der Pegel des Lösungsmittels steigt und fließt durch die Saugheberwirkung zurück in den Kolben mit erhitzter Lauge (Abb. 3).

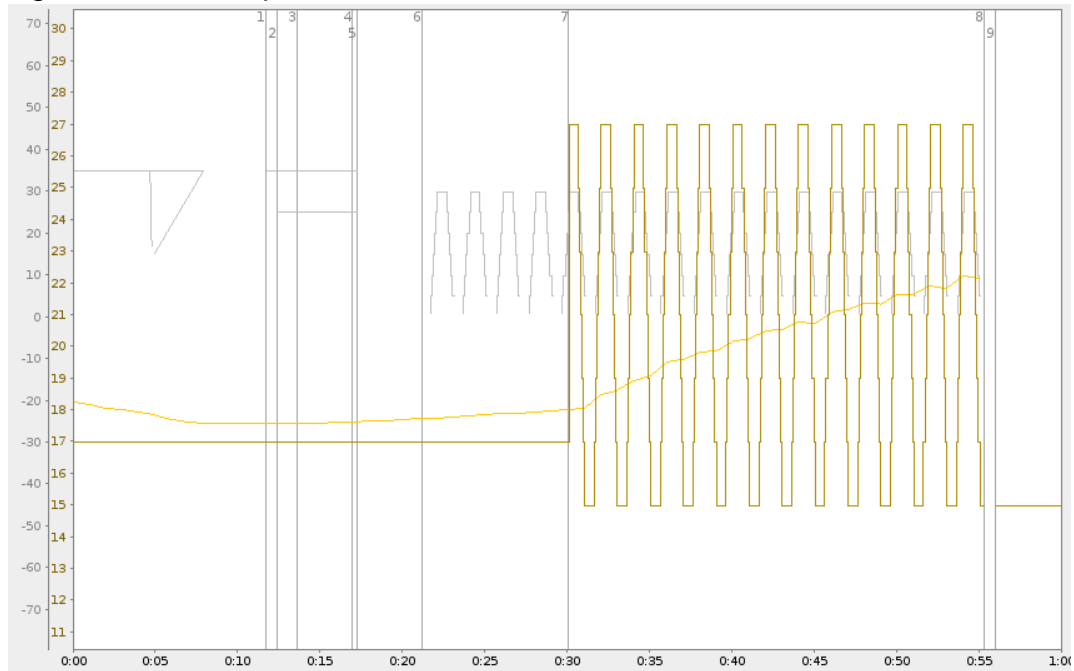


**Abb. 8:** Versuchsaufbau bei der Extraktion des Phycocyanin

Bereits nach kurzer Zeit war die Blaufärbung erkennbar. Nach mehrfacher Wiederholung dieses Prozesses und finalen Verdampfens der Lauge konnten 3mg Farbstoff gewonnen werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse Testexperiment:

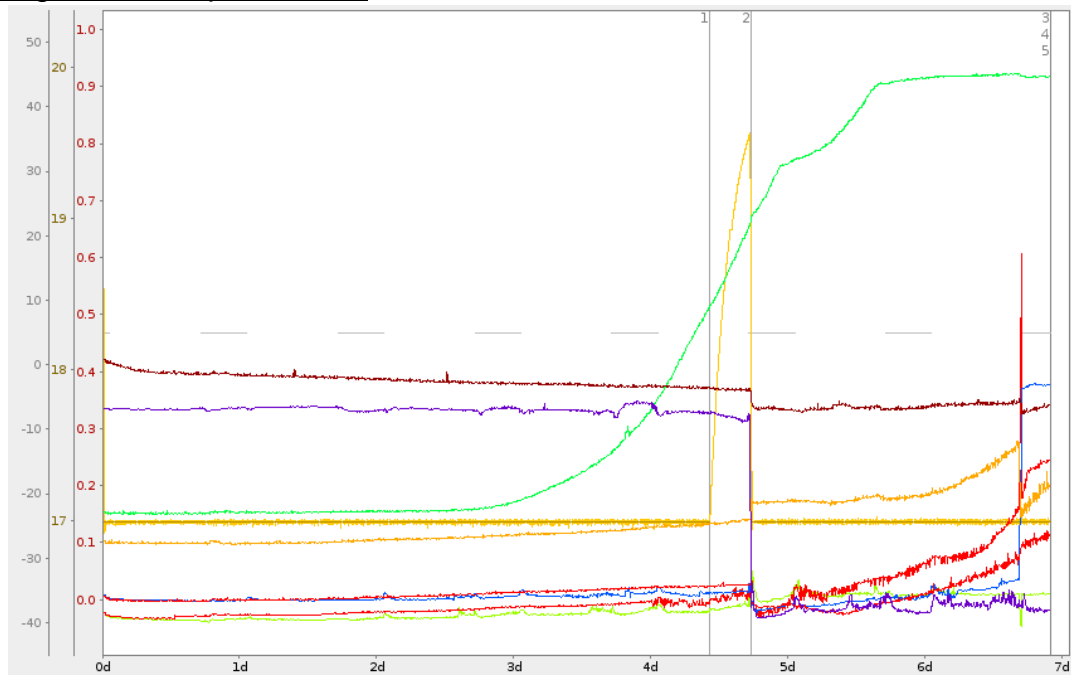


**Abb. 6:** Ausschnitt aus dem automatisch vom Programm des Multikultivators erzeugten Diagramm zum Testexperiment

Die X- Achse zeigt die Zeit in Stunden, während die Y-Achse die Stärke der verschiedenen Parameter darstellt. So geben die hellgrauen Werte die Lichtintensität in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und die Gelben die Temperatur in Grad Celsius an. Die Graphen stellen dann jeweils die zeitliche Entwicklung der einzelnen Werte dar. So stellt der Hellgraue die der Lichtintensität, der Dunkelgelbe die der eingestellten Temperatur und der Hellgelbe die der tatsächlichen Temperatur dar. Markierungen, welche durch vertikale Striche mit Nummer dargestellt werden, geben besondere Geschehnisse an.

Unser Testexperiment war erfolgreich. Zu Beginn testen wir erfolgreich die Steuerung einzelner Module und akute Veränderung der Parameter (linker Part der Graphen in Abb. 6). Im zweiten Schritt gelang es uns, die verschiedenen Parameter gleichzeitig bereits für die Zukunft festzulegen und somit einzelne Zyklen zu erzeugen (rechter Teil der Graphen in Abb. 6). Wir konnten uns also erfolgreich in das Programm zum Steuern des Multikultivators einarbeiten und uns die einzelnen Module zu nutzen machen.

## 3.2. Ergebnisse Experiment 1:

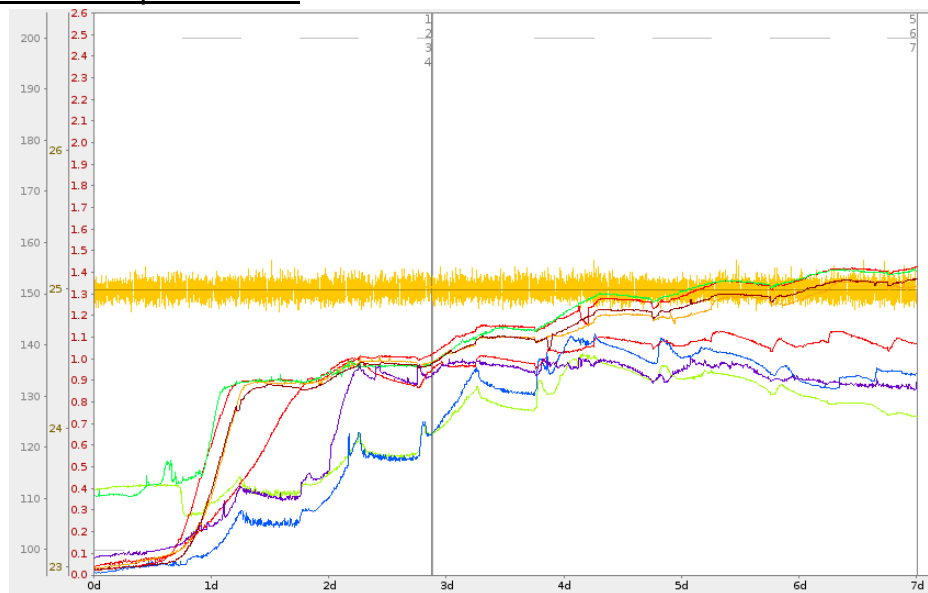


**Abb. 7:** Automatisch vom Programm des Multikultivators erzeugtes Diagramm zum ersten Experiment

Die X- Achse zeigt die Zeit in Tagen, während die Y-Achse die Stärke der verschiedenen Parameter darstellt. So geben die hellgrauen Werte die Lichtintensität in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die Gelben die Temperatur in Grad Celsius und die Roten die gemessene optische Dichte an. Die Graphen stellen dann jeweils die zeitliche Entwicklung der einzelnen Werte dar. So stellt der Hellgraue die der Lichtintensität, der Dunkelgelbe die der eingestellten Temperatur, der Hellgelbe die der tatsächlichen Temperatur und die Restlichen die der optischen Dichten der einzelnen Proben dar. Hierbei stellt der Violette die der ersten Probe, der Blaue die der zweiten Probe, der Grüne die der dritten Probe, der Lindgrüne die der vierten Probe, der Orange die der fünften Probe, der zu Beginn untere Hellrote die der sechsten Probe, der zu Beginn obere Hellrote die der siebten Probe, der Dunkelrote die der achten Probe dar. Markierungen, welche durch vertikale Striche mit Nummer dargestellt werden, geben besondere Geschehnisse an. Im endgültigen Diagramm zu unserem ersten Experiment (Abb. 7) fällt auf, dass die Proben anders als geplant zu Beginn eine sehr unterschiedliche Algenkonzentration besaßen und sich sehr unterschiedlich entwickelten. So könnte man vermuten, dass der grüne Graph als einziges eine sehr gute und schnelle Entwicklung der Algen aufweist, da das Algenwachstum zu Beginn eher schwächer ist, im Verlauf exponentiell zunimmt und zum Ende hin wieder abflacht. Dieses Wachstum deutet auf eines in den Wachstumsphasen 1, 2 und 3 hin, wobei die zweite vollständig zu erkennen ist. Beim Betrachten der Probe stellten wir eine ungewöhnliche Trübung fest. Die Farbe war hell grün und man erkannte die von der Luftversorgung erzeugten Luftbläschen, die eine Art umgekehrten Nebel bildeten. Die grüne Kurve hat auch ein ständiges Wachstum, was zeigt, dass hier keine Ruhephase eingehalten wurde. Auffällig ist, dass dieses Exemplar das einzige ist, welches mit einer optischen Dichte von ca. 1,5 startete. Alle weiteren, welche einen niedrigeren Startwert gegen 0 besaßen zeigten bis zum letzten halben Tag kein großes Wachstum. Das könnte daran liegen, dass die Algenkonzentration zu Beginn zu gering war, um ein erkennbares Wachstum aufzuweisen. Eine

weitere mögliche Erklärung wäre, dass diese Proben sich noch in der ersten Wachstumsphase befanden und sich somit noch an das neue Medium gewöhnen mussten. Diese Möglichkeit schließen wir jedoch aus, da die Proben aus denselben Lösungen hervorgehen und sich somit zu Beginn alle in derselben Wachstumsphase befinden sollten. Eine weitere Auffälligkeit ist, dass auch die Proben mit einem vergleichsweise höheren OD Wert kein deutliches Wachstum hervorbrachten. Dies könnte daran liegen, dass die Algenkonzentration zu Beginn zu hoch war und die Proben direkt in die Wachstumsphasen 3 und ein wenig später, erkennbar am Fallen der Graphen, 4 übergingen. Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf das Wachstum der Algen ist das Absinken des Wasserspiegels, was zum Steigen der Temperatur sowie dem Sinken der Algenkonzentration bei allen Proben bis auf der dritten führte. Im Allgemeinen ist also zu schlussfolgern, dass das Experiment aufgrund nur einer stichhaltigen Probe nicht als Referenzexperiment verwendet und somit erneut durchgeführt werden sollte. Dazu wäre es aufgrund des unterschiedlichen Wachstums wichtig, die Startkonzentration besser zu kontrollieren und die Parameter anzupassen.

### 3.3. Ergebnisse Experiment 2:



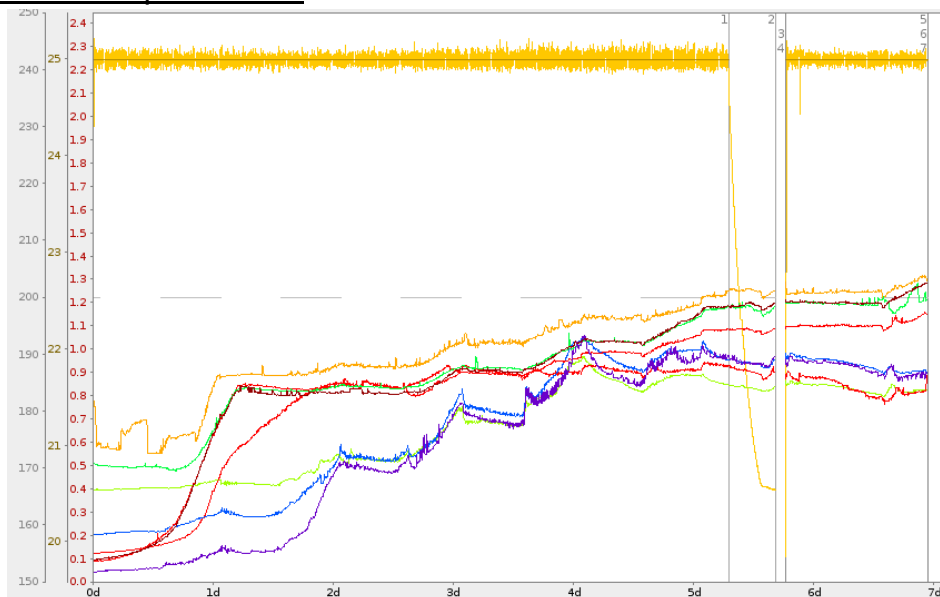
**Abb. 8:** Automatisch vom Programm des Multikultivators erzeugtes Diagramm zum zweiten Experiment

Die X- Achse zeigt die Zeit in Tagen, während die Y-Achse die Stärke der verschiedenen Parameter darstellt. So geben die hellgrauen Werte die Lichtintensität in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die Gelben die Temperatur in Grad Celsius und die Roten die gemessene optische Dichte an. Die Graphen stellen dann jeweils die zeitliche Entwicklung der einzelnen Werte dar. So stellt der Hellgrau die der Lichtintensität, der Dunkelgelbe die der eingestellten Temperatur, der Hellgelbe die der tatsächlichen Temperatur und die Restlichen die der optischen Dichten der einzelnen Proben dar. Hierbei stellt der Violette die der ersten Probe, der Blaue die der zweiten Probe, der Grüne die der dritten Probe, der Lindgrüne die der vierten Probe, der Orange die der fünften Probe, der zu Beginn untere Hellrote die der sechsten Probe, der zu Beginn obere Hellrote die der siebten Probe, der Dunkelrote die der achten Probe dar. Markierungen, welche durch vertikale Striche mit Nummer dargestellt werden, geben besondere Geschehnisse an. Unser zweites Experiment zeigt am Ende im Diagramm deutlich bessere Ergebnisse als das vorherige. Während wir zum eine deutlich ähnlichere Startkonzentration an Algen bei den meisten der Proben erreichen konnten, lässt sich zusätzlich ein wesent-



lich besseres Algenwachstum in sämtlichen Proben erkennen. Auch die zwei sehr kurzen Zwischenfälle weisen keine sichtbaren Veränderungen in der Kultivierung auf. Wir können an allen Proben ein zu Beginn stagnierendes, anschließend jedoch sehr rasantes und am Ende wieder abflachendes Wachstum feststellen, welches genau der Entwicklung der Probe 3 im letzten Experiment entspricht. So können wir auch hier die Wachstumsphasen 1, 2 und 3 erkennen, wobei die zweite komplett abgebildet ist. Aufgrund dieser Tatsache ist das Experiment als Referenzversuch nutzbar. Allerdings wollten wir ein weiteres Experiment als mögliches Referenzversuch starten, in welchem wir mit einer anderen spezifischeren Algenkonzentration in den Exemplaren starten. Diese sollte auf der optischen Dichte basierend gewählt und somit praktischer sein. Die Idee stammt aus einem Informationsgespräch mit Herr Arnold der Technische Universität München, Fakultät für Chemie und des Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie (WSSB). Des Weiteren wollen wir unserem Experiment einen Rahmen geben, welchen wir dadurch erreichen, dass wir unsere Ergebnisse auf eine OD Wert bis eins beschränken.

### 3.4. Ergebnisse Experiment 3:



**Abb. 9:** Automatisch vom Programm des Multikultivators erzeugtes Diagramm zum dritten Experiment

Die X- Achse zeigt die Zeit in Tagen, während die Y-Achse die Stärke der verschiedenen Parameter darstellt. So geben die hellgrauen Werte die Lichtintensität in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die Gelben die Temperatur in Grad Celsius und die Roten die gemessene optische Dichte an. Die Graphen stellen dann jeweils die zeitliche Entwicklung der einzelnen Werte dar. So stellt der Hellgraue die der Lichtintensität, der Dunkelgelbe die der eingestellten Temperatur, der Hellgelbe die der tatsächlichen Temperatur und die Restlichen die der optischen Dichten der einzelnen Proben dar. Hierbei stellt der Violette die der ersten Probe, der Blaue die der zweiten Probe, der Grüne die der dritten Probe, der Lindgrüne die der vierten Probe, der Orange die der fünften Probe, der zu Beginn untere Hellrote die der sechsten Probe, der zu Beginn obere Hellrote die der siebten Probe, der Dunkelrote die der achten Probe dar. Markierungen, welche durch vertikale Striche mit Nummer dargestellt werden, geben besondere Geschehnisse an. Nach Abschluss des dritten Experiments ist im Diagramm klar erkennbar, dass trotz der gleichen Verteilung einer Lösung mit einem OD Wert von 1 die dabei entstandenen

Proben verschiedene optische Dichten besitzen. Dieser Fakt zeigt, dass die Algenkonzentration in verschiedenen Teilen der Lösung variiert. Trotz dessen wird auch hier deutlich, dass ähnlich wie beim vorherigen Experiment die ersten drei Wachstumsphasen von allen Proben durchlaufen werden und ein starkes Wachstum erkennbar wird. Somit bildet auch dieses Experiment ein gelungenes Referenzexperiment und kann als solches verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, dass wir unsere Experimente auf einen Bereich bis zu einem OD Wert von maximal 1 fokussieren wollen, stellen die zwei Zwischenfälle (Markierungen 1 bis 4) auch kein größeres Problem dar. Das liegt daran, dass zu ihrem Eintreten bereits von allen Proben eine optische Dichte von annähernd 1 erreicht wurde.

### 3.5. Ergebnisse Experiment 4:

Durch Fertigstellung der Korrelation und Bestimmung eines Umrechnungsfaktors, könnten wir ausgehend von gemessenen OD-Werten auf die dazu korrelierte Masse schließen, ohne jedes Mal eine Messung vornehmen zu müssen.

### 3.6. Ergebnisse Experiment 5:

Beim Testen des in 2.2.6. beschriebenen Verfahren gelang uns unabhängig von verschiedenen Versuchsaufbauten keine erfolgreiche Knallgasprobe. Aufgrund dieser Tatsache und der uns auffallenden Problematik der Lagerung des Wasserstoffes, welche mit unseren beschränkten Mitteln nicht möglich war, entschieden wir uns dazu unsere Algensorte zu wechseln und den Einfluss der Kultivierung auf den Produktionsprozess für andere nützlicher Dinge zu untersuchen und zu versuchen diesen zu optimieren. Aufgrund unseres Gespräches mit den Fachleuten des Instituts für Umwelttechnik und Energiewirtschaft entschieden wir uns hierbei dann für die Alge Spirulina und den daraus gewinnbaren Farbstoff, welcher als natürlicher Lebensmittelfarbstoff nutzbar gemacht werden kann.

### 3.7. Ergebnisse Experiment 6:

Unser Experiment 6 lief ebenso, wie dasselbige mit anderer Algensorte erfolgreich und wir erhielten ein gut nutzbares Referenzexperiment sowie einen Umrechnungsfaktor für die Massenberechnung ausgehend vom OD-Wert.

### 3.8. Ergebnisse Experiment 7 (Soxhletextraktion):

Durchs Experiment 7 erarbeiteten wir einen vielversprechenden Versuchsaufbau und Prozess für die Farbstoffgewinnung aus der Alge Spirulina, welchen wir erfolgreich testeten. So konnten wir 3 mg Farbstoff durch die Extraktion gewinnen.

## **4. Ergebnisdiskussion**

Bei Betrachtung aller Ergebnisse ist aus unserer Sicht gut erkennbar, dass unser Projekt noch am Anfang seiner Laufbahn steht, noch viele Experimente folgen und Ideen einfließen werden. Jedoch haben wir es geschafft ohne Vorwissen unser eigenes System zu kreieren, in dem es uns möglich ist, Algen innerhalb der vier Wachstumsphasen zu beobachten und eine kontrollierte Kultivierung vorzunehmen. Des Weiteren konnten wir unser Projekt trotz des großen Rückschlags des Algenwechsels und dadurch unbrauchbar werdenden Experimentergebnissen fortführen und den Prozess der Farbstoffgewinnung in seiner Gesamtheit ausführen. Dies bildet eine sichere Grundlage und viele Möglichkeiten für Optimierungsansätze. Des Weiteren war es uns bereits möglich das durchs Arbeiten mit der Alge Chlamydomonas Reinhardtii erlangte Wissen zu nutzen und ein vielversprechendes Referenzexperiment, genauso wie eine Korrelation zum einfachen Vergleichen der Algenmassen zu erstellen. Des Weiteren gelang es uns unsere Fehlertoleranz zu senken. So machten wir zu Beginn noch einige

Fehler, indem wir vergaßen auf den Wasserpegel zu achten oder den Startkonzentrationen zu wenig Aufmerksamkeit schenkten, während wir nun aufgrund gut abgestimmter Werte und Methoden ein wunderbares Algenwachstum beobachten können. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass wir durch unser steriles Arbeiten sowie unserer exakten Messgeräte Veränderungen im dreistelligen Nachkommabereich erkennen und analysieren können. Auch wenn wir also noch keine weiteren Experimente samt Untersuchung vorweisen können, sollte das Potenzial und unsere Ambitionen erkennbar sein. Als Nächstes planen wir noch bis zum Wettbewerb weitere Experimente und die Herstellung von Gummibärchen mit Hilfe des selbst hergestellten Farbstoffs, um die praktische Anwendbarkeit zu untermauern. Selbstverständlich sollen auch erste Optimierungsversuche des Prozesses unternommen werden.

## **5. Zusammenfassung**

Zusammengefasst stehen wir noch am Anfang unserer Forschungen. Unser Ziel der Optimierung der Wasserstoffproduktion durch differenzierte Algenkultivierung ist noch nicht erreicht. Jedoch haben wir uns die Grundlagen angeeignet und ein funktionierendes System erarbeitet sowie erste Versuche durchgeführt. Dies bildet die Grundlage präzise Ergebnisse zu erreichen und besser voranzuschreiten. Das sich Proben durch die Veränderung der äußeren Einflüsse während der Kultivierung verändern, konnten jedoch nun auch wir durch unsere Versuche zeigen. Jetzt müssen wir weitere Experimente durchführen und die bestehenden erweitern sowie die entstehenden Veränderungen genau analysieren, um unserem Ziel näher zu kommen.

## 6. Quellen- und Literaturverzeichnis

Dr. Beatrix Vater-Dobberstein, Dr. Hans-Georg Hilfrich: „Versuche mit Einzellern“, Stuttgart 1982, S. 22-23

Ghirardi, M.L., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., Melis, A. (2000): Microalgae a Green Source of Renewable H<sub>2</sub>. Trends in Biotechnology, Vol. 18; pp. 506–511.

Harris, E.H. (2009): Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use in: The Chlamydomonas Sourcebook. Second Edition. Herausgegeben von Harris, E.H.. Academic Press, San Diego.

Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M. (2000): Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology, Vol. 122; pp. 127–135.

Hans G.Schlegel, Karin Schmidt: „Allgemeine Mikrobiologie“, New York 1981, S. 186

## 7. Unterstützungsleistungen

*Das Unternehmen Dow hat uns die finanziellen Mittel zur Verfügung gestellt unsere Pläne zu verwirklichen und die dazu nötigen Maschinen und weiteren Materialien zu besorgen.*

*Das Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der technischen Universität Hamburg ermöglichte uns durch ein Treffen, wo wir Fragen stellen und ihr Labor besichtigen konnten, gut ins Thema einzusteigen.*

*Herr Arnold, Technische Universität München, Fakultät für Chemie, Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie (WSSB), brachte uns auf die Idee eines dritten Experiments mit einer Startkonzentration basierend auf der optischen Dichte sowie eine Korrelation zwischen der optischen Dichte und der entstandenen Biomasse durchzuführen.*