

**Untersuchungen der Speicherlipidbildung in Mikroalgen und *in situ*
Bestimmung durch Fluoreszenzspektroskopie**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Alexander Kettner

aus Magdeburg

Bayreuth, 2024

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 11/2016 bis (12/2022) an der Hochschule Anhalt, Fachbereich für angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik, betreut durch Frau Professorin Dr. Carola Griehl, in Kooperation mit der Fakultät für angewandte Naturwissenschaften der Hochschule Coburg unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Matthias Noll angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.).

Form der Dissertation:	Monographie
Dissertation eingereicht am:	14.06.2023
Zulassung durch Leistungsgremium:	07.07.2023
Wissenschaftliches Kolloquium:	30.01.2024
Amtierender Direktor:	Professor Dr. Jürgen Köhler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr.	Matthias Noll	(Gutachter)
Prof. Dr.	Andreas Römpp	(Gutachter)
Prof. Dr.	Dirk Schüler	(Gutachter)
Prof. Dr.	Tillmann Lüders	(Vorsitz)
Prof. Dr.	Carola Griehl	

*„Wissen nennen wir den kleinen Teil
unserer Unwissenheit, den wir geordnet
und klassifiziert haben“*

- Ambrose Gwinnett Bierce -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	IX
Abstract	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
Abbildungsverzeichnis	XVII
Tabellenverzeichnis	XIX
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Speicherlipide in Mikroorganismen	- 2 -
1.1.1 Biotechnologische Kultivierungsstrategien.....	- 3 -
1.1.2 Speicherlipid-Induktoren.....	- 4 -
1.2 Polyhydroxyalkanoate	- 7 -
1.2.1 Eigenschaften von Polyhydroxyalkanoaten	- 7 -
1.2.2 Polyhydroxybutyrat-Biosynthese und Aufbau der Granula	- 8 -
1.2.3 Organismen und industrielle Relevanz.....	- 10 -
1.2.4 Polyhydroxybutyrat-Bildung in Cyanobakterien	- 11 -
1.3 Triacylglycerol-Bildung in Mikroalgen	- 13 -
1.4 Bestimmung von Polyhydroxyalkanoaten und Triacylglycerole	- 15 -
1.5 Fluoreszenzspektroskopie	- 18 -
1.5.1 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von Speicherlipiden in Mikroalgen	- 18 -
1.5.2 Einflussfaktoren auf die Fluoreszenz-Färbeprozess.....	- 22 -
1.6 Datenwissenschaftliche Methoden in der Algenbiotechnologie	- 25 -
1.6.1 Systematische Reviews und Metadatenanalyse	- 26 -
1.6.2 Statistische Versuchsplanung	- 26 -
1.6.3 Modell-gestützte Datenanalyse und Prognosen	- 27 -
2 Motivation und Hypothesen	- 30 -

3	Material und Methoden	- 33 -
3.1	Chemikalien	- 33 -
3.2	Experimenteller Aufbau und Probenverarbeitung.....	- 33 -
3.3	Organismen und Kultivierungsbedingungen.....	- 34 -
3.3.1	<i>Cupriavidus necator</i>	- 34 -
3.3.2	<i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 35 -
3.3.3	Eukaryotische Mikroalgen	- 37 -
3.4	Molekularbiologische Methoden und verwendete Isolate	- 38 -
3.5	Biomassebestimmung und Produktaufarbeitung.....	- 41 -
3.5.1	Biomassebestimmung und Optische Dichte.....	- 41 -
3.5.2	Elementare Zusammensetzung der Biomasse	- 41 -
3.5.3	Polyhydroxybutyrat-Extraktion.....	- 42 -
3.5.4	Polymeranalytik	- 42 -
3.6	Fluoreszenzspektroskopie	- 42 -
3.6.1	Geräteaufbau und methodisches Set-Up	- 43 -
3.6.2	Untersuchung spektraler Bereiche.....	- 44 -
3.6.3	Charakterisierung von LipidGreen2	- 44 -
3.6.4	Analyse und Optimierung der Färbebedingungen	- 45 -
3.6.5	Datenprozession	- 45 -
3.6.6	Chlorophyll- und Phycocyanin-Fluoreszenz	- 46 -
3.7	Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie	- 46 -
3.8	Chromatographische Methoden	- 46 -
3.8.1	Quantifizierung von Polyhydroxybutyrat und Glykogen.....	- 47 -
3.8.2	Bestimmung der Polyhydroxyalkanoat-Zusammensetzung.....	- 47 -
3.8.3	Analyse der Lipidgruppen	- 48 -
3.8.4	Analyse der Fettsäurezusammensetzung.....	- 49 -
3.9	Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration.....	- 49 -
3.10	Datenwissenschaftliche Methoden	- 50 -
3.10.1	Systematisches Review und Metadatenanalyse	- 50 -
3.10.2	Modellierungen	- 50 -
3.10.3	Statistische Methoden	- 52 -
3.10.4	Bestimmung der Moleküleigenschaften und chemische Strukturformeln	- 53 -

4	Ergebnisse	- 54 -
4.1	Charakterisierung von LipidGreen2	- 55 -
4.1.1	Identifizierung der spektralen Bereiche von LipidGreen2	- 55 -
4.1.2	Bestimmung der Fluoreszenzeffizienz	- 56 -
4.1.3	Stabilitätsuntersuchungen.....	- 57 -
4.2	<i>In situ</i> -Bestimmung von Polyhydroxybutyrat und Biomasse in <i>Cupriavidus necator</i> durch Fluoreszenzspektroskopie	- 59 -
4.2.1	Analyse abiotischer und biotischer Einflussfaktoren auf den Fluoreszenz- Färbeprozesses	- 60 -
4.2.2	Korrelationsanalysen und Erstellung von Kalibrierdaten	- 63 -
4.2.3	Untersuchung der Reproduzierbarkeit	- 65 -
4.2.4	Untersuchung der Reproduzierbarkeit durch modellgestützte Methoden.....	- 69 -
4.3	Untersuchung der Polyhydroxybutyrat-Bildung in <i>Leptolyngbya</i> sp.....	- 73 -
4.3.1	Molekularer Nachweis des PhaC ^{III} -Genabschnittes	- 74 -
4.3.2	Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien durch Metadatenanalyse	- 76 -
4.3.3	Analyse abiotischer und biotischer Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat- Bildung	- 78 -
4.3.4	Untersuchung der Effekte von Mangelzuständen auf die Biomassezusammensetzung bei mixotropher Kultivierung	- 81 -
4.3.5	Extraktion- und Polymer-Charakterisierung	- 86 -
4.4	<i>In situ</i> -Bestimmung von Speicherlipiden in Mikroalgen mit LipidGreen2	- 88 -
4.4.1	Polyhydroxybutyrat-Bestimmung in <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255 durch LipidGreen2-Fluoreszenz.....	- 89 -
4.4.2	Biomassebildungs- und Lipid-Zusammensetzung in eukaryotischen Mikroalgen-	- 92 -
4.4.3	Bestimmung der Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration in eukaryotischen Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz	- 94 -
4.5	Differenzierung der Speicherlipidart durch LipidGreen2-Fluoreszenz.....	- 97 -
4.5.1	Analyse der Häufigkeitsverteilungen der Emissionswellenlängen	- 97 -
4.5.2	Modell-gestützte Klassifizierung	- 100 -

5	Diskussion	- 102 -
5.1	Fluorometrische Polyhydroxybutyrat- und Biomasse-Bestimmung in <i>Cupriavidus necator</i> mit LipidGreen2	- 103 -
5.1.1	Einflussgrößen auf die LipidGreen2-Fluoreszenz.....	- 103 -
5.1.2	Modellierung der Biomasse- und Polyhydroxybutyrat-Bildung durch Fluoreszenz	- 108 -
5.2	Effekte auf Polyhydroxybutyrat-Bildung in <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255..	- 112 -
5.2.1	Kultivierungsbedingungen und Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung	- 112 -
5.2.2	Biomasse- und Speicherlipidzusammensetzung	- 119 -
5.2.3	Nachweis der PHB-Bildung auf molekularer und mikroskopischer Ebene	- 120 -
5.3	Speicherlipidbestimmung in Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz.....	- 121 -
5.3.1	Modellierung der Polyhydroxybutyrat-Konzentration in <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 122 -
5.3.2	Modellierung der Lipid/Triacylglycerol-Konzentration in eukaryotischen Mikroalgen	- 124 -
5.4	<i>In situ</i> Differenzierung der Speicherlipidart.....	- 126 -
5.4.1	Differenzierung durch das Emissionswellenlängen-Maximum	- 126 -
5.4.2	Differenzierung durch Modell-gestützte Analysen	- 128 -
6	Zusammenfassung und Fazit.....	- 129 -
6.1	Effekt der molekularen Eigenschaften und Einfluss abiotischer und biotischer Faktoren auf die LipidGreen2-Fluoreszenz.....	- 129 -
6.2	Wirkung biotischer und abiotischer Faktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung in <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 130 -
6.3	Einfluss phylogenetischer Distanzen und Morphologie auf die Speicherlipid-Bestimmung in Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz	- 130 -
6.4	Differenzierung der Speicherlipidart in Abhängigkeit der Zusammensetzung.....	- 131 -
6.5	Fazit	- 132 -
7	Ausblick.....	- 133 -
8	Referenzen.....	- 135 -
9	Danksagung.....	- 162 -

10	Anhang	- 164 -
10.1	Abbildungen	- 164 -
10.2	Tabellen	- 169 -
11	Publikationsliste	- 177 -
11.1	Fachartikel mit Bezug zur Promotion	- 177 -
11.2	Konferenzbeiträge	- 177 -
11.3	Mitarbeit an Experimenten	- 178 -
12	Eidesstattliche Erklärungen	- 179 -

Zusammenfassung

Speicherlipide (SL) aus Mikroalgen, zu denen die Stoffgruppen der Triacylglycerole (TAGs) und Polyhydroxyalkanoate (PHAs) zählen, sind eine umweltfreundliche und nachhaltige Alternative zu erdölbasierenden Produkten. Unter ungünstigen Umweltbedingungen werden diese Kohlenstoff- und Energiespeichersubstanzen intrazellulär in Kompartiment-ähnlichen Strukturen akkumuliert. Der abundanteste Vertreter der PHAs ist Polyhydroxybutyrat (PHB). Die Herausforderungen für eine wirtschaftlich rentable industrielle Produktion von PHB liegen in der Identifikation geeigneter Organismen sowie der Analyse und Optimierung des Bildungsprozesses für eine erfolgreiche Skalierung. Zudem ist ein zeitnahe Monitoring der Biomasse- und Produktbildung zur Identifizierung geeigneter Erntezeitpunkte von großer Bedeutung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einerseits den Prozess der PHB-Bildung in der filamentösen Mikroalge *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 zu untersuchen und andererseits eine fluoreszenzspektroskopische Methode zur Detektion von bakteriellem PHB in *Cupriavidus necator* zu entwickeln und auf PHB- und TAG-synthetisierende Mikroalgen zu übertragen.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte das Schlüsselgen *phaC^{III}* der bakteriellen PHB-Bildung identifiziert und mittels PCR in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 nachgewiesen werden. Durch die Analyse und Optimierung abiotischer und biotischer Variablen mithilfe von Metadatenanalysen und statistischer Versuchsplanung konnte gezeigt werden, dass Stickstoff-Mangel eine grundlegende Voraussetzung für eine erhöhte PHB-Bildung darstellte. Mixotrophe Mangelkultivierung katalysierte dabei die PHB-Bildung, woraus eine dreistufige Kultivierungsstrategie resultierte. Durch die Bestimmung und Charakterisierung des extrahierten Produkts konnte die PHB-Bildung weiterhin bestätigt werden. Dementsprechend ist *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 aufgrund der hohen PHB-Produktionskapazität eine geeignete Mikroalge für die technische Herstellung von PHB in Photobioreaktoren.

Für die zeitnahe Bestimmung der SL-Konzentration wurde Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Um die Eignung von LipidGreen2 (LG2) als Fluoreszenzfarbstoff zu prüfen, wurden die spektralen Eigenschaften, die Stabilität und die Quantenausbeute bestimmt.

Anschließend erfolgte die Optimierung des Färbeprozesses im Vergleich zu den Farbstoffen BODIPY^{493/503} und Nile red. LG2 erwies sich als geeigneter Farbstoff zur Visualisierung und

Detektion von PHB in *C. necator*. Der Farbstoff zeichnete sich durch eine hohe Stabilität, polaritäts-empfindlichen Verhalten (Solvatochromie) und keine konzentrationsbedingten Anomalien aus. Die Konstellation aus biotischen und abiotischen Faktoren wirkten dabei auf die Inkubationszeit zwischen Fluoreszenzfarbstoff und der Probe ein. Als bedeutendste Variablen konnte die Biomassekonzentration und Farbstoffkonzentration identifiziert werden.

Durch die Einbeziehung des Seitwärtsstreulichtes (SSC) wurden die Auswirkungen der Biomasse auf das Messsystem berücksichtigt, wodurch sich hohe lineare Zusammenhänge der Fluoreszenz zu den analytischen Referenzwerten ergaben. Unter Nutzung von Modell-gestützten Analysen konnten anschließend die analytischen Werte mit hoher Genauigkeit für N-Mangel, P_i-Mangel und NaCl-gestressten Kulturen wiedergegeben und vorhergesagt werden.

Im Anschluss wurde die Methode zur Bestimmung von PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 sowie von Lipid/TAG in den eukaryotischen Mikroalgen *Stichococcus* sp. WB02, *Porphyridium purpureum* und *Nannochloropsis salina* eingesetzt. Die Verwendung von SSC und Fluoreszenz war unabhängig von SL-Art und Organismus möglich. Das Modell der linearen Regression wurde dabei erfolgreich zur Bestimmung der Biomasse- und SL-Konzentration angewandt. Zudem waren Klassifizierungsmodelle in der Lage, den Solvatochromie-bedingten Effekt von LG2 zu nutzen, um anhand der Fluoreszenzdaten zwischen PHB und Lipid/TAG zu unterscheiden.

Die Kombination aus statistischer Versuchsplanung und datenwissenschaftlicher Auswertung der Ergebnisse erwies sich als eine effiziente Strategie zur Identifizierung von Einflussfaktoren und Optimierung von Zielgrößen. Die erstellte Fluoreszenzmethode in Verknüpfung mit Modell-gestützter Analysen zeigte eine hohe Wiedergabegenauigkeit der Biomasse- und der SL-Konzentration. Die entwickelte Methodik erwies sich als selektiv und übertragbar.

Ein entscheidender Vorteil der fluoreszenzspektroskopischen Methode ist die deutlich reduzierte Zeit, die im Vergleich zu chromatographischen Methoden wie der HPLC benötigt wird. Während die spektroskopischen Messungen nur 6-7 min inklusive der Probenvorbereitung dauern, benötigt die HPLC-Analyse 2-3 Stunden, ohne die notwendige Trocknung der Probe zu berücksichtigen. Dieses Zeitersparnis qualifiziert die fluoreszenzspektroskopische, neben der geringeren Investitionskosten, als eine effiziente Methode für eine online-Bestimmung von PHB und TAG in Mikroorganismen. Die vorliegenden Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, die angewandte Methode zur Identifizierung weiterer relevanter Variablen zu erweitern. Ein Beispiel dafür ist das Pigment Phycocyanin, das kommerziell als Lebensmittelfarbstoff eingesetzt wird. Die entwickelte Methode bietet somit eine Basis für die Entwicklung eines flexiblen und dezentralen Monitorings von Zielvariablen in Mikroalgen durch at-line-Monitoring.

Abstract

Storage lipids (SL) from microalgae, including the substance groups of triacylglycerols (TAGs) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), are an environmentally friendly and sustainable alternative to petroleum-based products. Under adverse environmental conditions, these carbon and energy storage substances are accumulated intracellularly in compartment-like structures. The most abundant representative of PHAs is polyhydroxybutyrate (PHB). The challenges for economically viable industrial production of PHB lie in the identification of suitable organisms and the analysis and optimization of the formation process for successful scaling. Furthermore, timely monitoring of biomass and product formation to identify suitable harvesting times is of great importance. The aim of this work was to investigate the process of PHB formation in the filamentous microalga *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255, and to develop a fluorescence spectroscopic method for detecting bacterial PHB in *Cupriavidus necator* and to apply this method for the detection of PHB- and TAG in microalgae.

In the course of the investigations, the key gene *phaC*^{III} for bacterial PHB formation was identified and detected in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 using PCR. By analyzing and optimizing abiotic and biotic variables with metadata analyses and statistical experimental design, it was shown that nitrogen deficiency is a fundamental requirement for increased PHB formation. Mixotrophic deficiency culture conditions catalyzed PHB formation, resulting in a three-stage culturing strategy. The determination and characterization of the extracted product further confirmed PHB formation. Accordingly, *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 is a suitable microalgae for the technical production of PHB in photobioreactors due to its high PHB production capacity.

For the timely determination of SL concentration, fluorescence spectroscopy was used. To test the suitability of LipidGreen2 (LG2) as a fluorescence dye, its spectral properties, stability, and quantum yield were determined. Subsequently, the staining process was optimized in comparison to the dyes BODIPY^{493/503} and Nile red. LG2 proved to be a suitable dye for visualizing and detecting PHB in *C. necator*. The dye was characterized by high stability, polarity-sensitive behavior (solvatochromism), and no concentration-related anomalies. The constellation of biotic and abiotic factors affected the incubation time between the fluorescence

dye and the sample. Biomass concentration and dye concentration were identified as the most significant variables.

By incorporating the sample's side scatter (SSC), the effects of biomass on the measurement system were considered, resulting in high linear correlations of fluorescence to the analytical reference values. Subsequent model-based analyses were able to accurately reproduce and predict during N-deficiency, P_i-deficiency, and NaCl-stressed cultures.

The method was afterwards applied to determine PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 and Lipid/TAG in the eukaryotic microalgae *Stichococcus* sp. WB02, *Porphyridium purpureum*, and *Nannochloropsis salina*. The use of SSC and fluorescence was independent of SL type and organism. The linear regression model was successfully used to determine biomass and SL concentration. Furthermore, classification models were able to use the solvatochromism effect of LG2 to distinguish between PHB and Lipid/TAG based on fluorescence data.

The combination of statistical experimental design and applied data scientific evaluation proved to be an efficient strategy for identifying influencing factors and optimizing target variables. The developed fluorescence method in conjunction with model-based analyses showed high accuracy in reproducing biomass and SL concentration in the tested organisms. The developed methodology proved to be selective and transferable.

A crucial advantage of the fluorescence spectroscopic method is the significantly reduced time required compared to instrumental analytics like HPLC. While the spectroscopic measurements take only 6-7 min including sample preparation sample, HPLC analysis requires 2-3 h without considering the necessary sample drying. This time saving makes the fluorescence spectroscopic method efficient and cost-effective for a timely investigation of PHB and TAG in microorganisms.

The present results open up the possibility to extend the applied method for the identification of further relevant variables. An example of this is the pigment phycocyanin, which is commercially used as a food coloring agent. The method thus offers new perspectives for the development of a flexible and decentralized monitoring of target variables in microalgae by at-line-monitoring.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der ROC
BY	BODIPY ^{493/503}
C/N	Verhältnis aus Gesamtkohlenstoff zu Gesamtstickstoff
CA	Klassifizierungsgenauigkeit
CARS	Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DCM	Durchflusszytometrie
DF	Anzahl der Freiheitsgrade
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoE	Statistische Versuchsplanung
ED-Weg	Entner-Doudoroff-Weg / 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg oder KDPG-Weg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	Evaporierender Lichtstreuendetektor
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg / Glycolyse
EPA	Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
FAME	Fettsäuremethylester
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit MS
GE	Gasaustausch
GEL	Gasaustauschlimitation
HB	3-Hydroxybutyrat
4-HB	4-Hydroxybutyrat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	3-Hydroxyvalerat
IFE	Innere Filtereffekt
KNN	Künstliches neuronales Netzwerk
LC	Flüssigkeitschromatographie
lcl-PHA	Langkettige PHA

LG2	LipidGreen2
LR	Modell Lineare Regression
LRE	Modell Logistische Regression
MAE	Mittlerer absoluter Fehler
mcl-PHA	Mittelkettige PHA
MS	Massenspektrometer
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NP _i -Mangel	Nitrat- und Phosphatmangel
NR	Nile red
P(3HB-co-4HB)	Poly(3-hydroxybutyrat-co-4-hydroxybutyrat)
PC	Phycocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PhaA	Acetyl-CoA Acetyltransferase
PhaB	Oxidoreductase/ Acetoacetyl-CoA Reductase
<i>phaC</i>	PhaC-kodierender Genabschnitt
PhaC	PHA-Synthase/Polymerase
PhaE	Untereinheit von PhaC
PhaR	Repressorprotein der PHA-Synthase
PhaZ	PHA-Depolymerase
PHB	Polyhydroxybutyrat
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)
P _i	Phosphat
PL	Polare Lipidgruppen
PLS	Methode der kleinsten Quadrate
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
R	Pearson Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäuren
ROC	Receiver Operating Characteristics, Grenzwertoptimierungskurve
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase-oxygenase
scl-PHA	Kurzkettige PHA
SL	Speicherlipid
SPV-Assay	Sulfophosphovanillin Assay
SSC	Seitwärtsstreulicht
SVM	Modell Support Vector Machine
TAG	Triacylglycerole

TCA	Tricarbonsäurezyklus / Citratzyklus
TES	Spurenelementlösung
TR	Entscheidungsbaum
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
W ²	Wiederholbarkeit
WS/DGAT	Wachsestersynthase/Diacylglycerol-O-Acyltransferase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Speicherlipide in Mikroorganismen.	- 2 -
Abb. 2: Einfluss von Mangel- und Überflussbedingungen	- 4 -
Abb. 3: Allgemeine chemische Struktur von Polyhydroxyalkanoaten.....	- 7 -
Abb. 4: Zyklus der PHB-Biosynthese	- 9 -
Abb. 5: Schematische Darstellung der PHB-Bildung in Cyanobakterien	- 12 -
Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der Triacylglycerol-Biosynthese in Mikroalgen	- 14 -
Abb. 7: Fluoreszenz Exzitations-Emissions-Spektren.....	- 20 -
Abb. 8: Herangehensweise datenwissenschaftlicher Arbeiten	- 25 -
Abb. 9: Allgemeine Übersicht der Probenverarbeitung.	- 33 -
Abb. 10: Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Messdurchführung	- 43 -
Abb. 11: Exzitation-Emissions-Matrix von LipidGreen2	- 56 -
Abb. 12: Bestimmung der Quantenausbeute von LipidGreen2 und Nile red.....	- 57 -
Abb. 13: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von LipidGreen2 (grün) und Nile red.....	- 58 -
Abb. 14: Relativer Einfluss untersuchter Parameter auf die Fluoreszenz	- 60 -
Abb. 15: Lineare Regression des Seitwärtsstreulichtes zur Biomassekonzentration	- 64 -
Abb. 16: Korrelationsmatrix korrigierter Fluoreszenzwerte im Vergleich zur	- 65 -
Abb. 17: Biomassekonzentrationen ermittelt durch Seitwärtsstreulicht.....	- 66 -
Abb. 18: Berechnete Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen mit den korrigierten Fluoreszenzwerten.....	- 68 -
Abb. 19: Auftragung der durch Fluoreszenz modellierten Polyhydroxybutyrat- Konzentrationen	- 70 -
Abb. 20: Modellierung der Biomassebildung und der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Konzentration	- 72 -
Abb. 21: Agarosegel-Elektrophorese untersuchter Mikroalgenisolate.....	- 74 -
Abb. 22: Auswertung der Metadatenanalyse.....	- 77 -
Abb. 23: Photographische Aufnahmen des Versuchsaufbaus	- 78 -
Abb. 24: Modellergebnisse der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung.....	- 79 -

Abb. 25: Entscheidungsbaum zur Evaluierung der Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat (PHB)-Bildung	- 80 -
Abb. 26: Biomassebildung von <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 82 -
Abb. 27: Polyhydroxybutyrat (PHB)- und Glykogenbildung in <i>Leptolyngbya</i> sp.	- 83 -
Abb. 28: Vergleich der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Produktivität von <i>Leptolyngbya</i> sp. .	- 84 -
Abb. 29: FTIR-Spektren des extrahierten Polyhydroxybutyrat (PHB) aus <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 86 -
Abb. 30: GC-MS Ergebnisse des Polyhydroxyalkanoat aus <i>Leptolyngbya</i> sp.....	- 87 -
Abb. 31: Zusammenhang der Phycocyanin	- 89 -
Abb. 32: Modellierung der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Konzentrationen in <i>Leptolyngbya</i> sp.	- 91 -
Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Polyhydroxybutyrat-Granula	- 92 -
Abb. 34: Änderungen der Biomasse.....	- 93 -
Abb. 35: Auftragung der Modellwerte gegen die Beobachtungen der Biomasse	- 95 -
Abb. 36: Bestimmung der Biomasse, Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration	- 96 -
Abb. 37: Häufigkeitsverteilung der Emission bei der Polyhydroxybutyrat-Bestimmung..	- 98 -
Abb. 38: Häufigkeitsverteilung der Emission bei Lipid/Triacylglycerol-Bestimmung	- 99 -
Abb. 39: Grenzwertoptimierungskurven der Klassifizierungsmodelle	- 101 -
Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidkörpern.....	- 125 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Strategien für die Kultivierung von Mikroalgen.....	- 3 -
Tab. 2: Eigenschaften von Polyhydroxyalkanoaten	- 8 -
Tab. 3: Methodische Auswahl der Speicherlipidbestimmung.....	- 17 -
Tab. 4: Fluorometrische Speicherlipidmessung in Mikroalgen	- 21 -
Tab. 5: Medien für die Polyhydroxybutyrat-Synthese mit <i>Cupriavidus necator</i>	- 34 -
Tab. 6: Eingesetzte Faktoreneinstellungen im statistischen Versuchsplan.	- 36 -
Tab. 7: Medienzusammensetzung bei der Kultivierung eukaryotischer Mikroalgen	- 37 -
Tab. 8: Verwendete Primer für die Detektion des PhaC ^{III} -Genabschnittes durch Polymerasekettenreaktion	- 38 -
Tab. 9: Protokoll der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des PhaC ^{III} -	- 39 -
Tab. 10: Verwendete Organismen für die Isolation genomischer DNA	- 40 -
Tab. 11: Eingesetzte Parameter im statistischen Versuchsplan. Plan:	- 45 -
Tab. 12: Genutzte Modelle und deren Einstellungen.	- 52 -
Tab. 13: Resultierende Färbebedingungen in Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbstoffe	- 62 -
Tab. 14: p-Werte aus t-Tests der durch das Seitwärtsstreulicht ermittelten Biomasse- Konzentrationen	- 67 -
Tab. 15: t-Tests der durch Fluoreszenz ermittelten Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen	- 69 -
Tab. 16: Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungsmodelle.....	- 70 -
Tab. 17: Vergleich der Modellgenauigkeit der genutzten Methoden zur Polyhydroxybutyrat- Berechnung.....	- 71 -
Tab. 18: t-Test-Statistik der Modellwerte gegen die analytischen Referenzdaten	- 73 -
Tab. 19: Nachweis des PhaC ^{III} -Genabschnittes (<i>phaC^{III}</i>) in Mikroalgenisolaten.	- 75 -
Tab. 20: Auswertung der Studien zur Polyhydroxybutyrat-Bildung in Cyanobakterien ...	- 76 -
Tab. 21: Konzentrationen und Zusammensetzung der Biomassebestandteile von <i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	- 85 -
Tab. 22: Modellergebnisse der Polyhydroxybutyrat-Bestimmung in <i>Leptolyngbya</i> sp.	- 90 -
Tab. 23: Modellergebnisse zur Bestimmung der Biomasse, Lipid- und Triacylglycerol- Konzentration in den untersuchten eukaryotischen Mikroalgen.	- 94 -

Tab. 24: t-Test-Ergebnisse der Bestimmung von Biomasse, Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration durch das Modell Lineare Regression	- 95 -
Tab. 25: Übersicht der Ergebnisse der Emissionswellenlängen-Häufigkeitsverteilung. ...	- 99 -
Tab. 26: Test and Score Ergebnisse der untersuchten Modelle.....	- 100 -
Tab. 27: Verhältnis korrekt zu falsch zugeordneten Polyhydroxyalkanoat- und Triacylglycerol-Instanzen.....	- 101 -
Tab. 28: Vergleich der molekularen Eigenschaften von Nile red und LipidGreen2.....	- 106 -
Tab. 29: Polyhydroxybutyrat-Bildung in Abhängigkeit der Mangelbedingung.	- 118 -
Tab. 30: Molekulare Eigenschaften von ausgewählten theoretischen Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) und Triacylglycerole (TAGs).....	- 127 -

1 Einleitung

Die Verbrennung fossiler Energieträger ist der größte CO₂-Emittent und ein eminent wichtiger Beitrag zum anthropogenen Anteil des Klimawandels [1]. Die zunehmende Produktion und Verwendung von Kunststoffen stellt ein weiteres Umwelt- und auch Gesundheitsproblem dar. Die ebenfalls aus fossilen Energieträgern produzierten polyolefinen Kunststoffe führen aufgrund ihrer geringen Abbaubarkeit zu einer hohen Persistenz in der marinen und terrestrischen Umwelt, wo sie nicht nur eine Vielzahl von Organismen direkt schädigen, sondern durch Aufnahme unter anderem als Mikroplastik akkumuliert in den Nahrungskreislauf zurückgeführt werden. Dabei gelangen jährlich 4 -12 Millionen Tonnen produzierter Kunststoff in die Ozeane [2]. Die Suche nach erneuerbaren Energiequellen ist daher zu einem wichtigen Forschungsschwerpunkt geworden. Dabei stellen Mikroalgen eine bedeutende Alternative als erneuerbare Ressource hochwertiger Lipide für den Nahrungsmittelbereich, Pharmazeutika und auch den Energiesektor dar, da sie durch die oxygene Photosynthese und CO₂-Fixierung photoautotroph Biomasse aufbauen können [3]. Die aus Mikroalgen gewonnenen Produkte zeigen nicht nur ein erhebliches Potenzial für Anwendungen in zahlreichen industriellen Bereichen, sondern wirken durch die Fixierung von atmosphärischen CO₂ dem Klimawandel entgegen. Mikroalgen kommen in vielen Habitaten vor und sind in der eukaryotischen sowie prokaryotischen Domäne (Cyanobakterien) vertreten. Eukaryotische Mikroalgen werden wiederum in neun Gruppen unterteilt: Glaucophyta, Rhodophyta (Rotalgen), Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta und Chlorophyta (Grünalgen) [4]. Bislang wurden 167.950 Algen-Spezies und Subspezies dokumentiert [5].

Unter dem Aspekt einer nachhaltigen Bioökonomie und der Substitution fossiler Energieträger stehen die Speicherlipide (SL) der Triacylglycerole (TAGs) oder die Biopolymerklasse der Polyhydroxyalkanoate (PHAs) aus Mikroalgen daher im besonderen Fokus. Denn im Vergleich zu den höher entwickelten Pflanzen weisen Mikroalgen eine höhere Biomasse-Produktivität auf und lagern Lipide in höheren prozentualen Verhältnissen ein [6].

1.1 Speicherlipide in Mikroorganismen

Speicherstoffe in Mikroorganismen dienen dazu das Wachstum und die Reproduktionsrate aufrecht zu erhalten, wenn externe Substratquellen teilweise oder vollständig erschöpft sind [7]. Speicherstoffe umfassen die chemischen Stoffklassen der Kohlenhydrate, Fette und Polyester. Allen gemein ist das hohe Molekulargewicht, wodurch ein Anstieg des osmotischen Drucks in der Zelle geringgehalten wird. Die Biosynthese wird in der Regel bei einem Überschuss an verwertbaren Substraten initiiert [7]. Speicherlipide (SL) werden hauptsächlich in adulten Zellen unter Mangel an essenziellen Makro- und Mikronährstoffen oder dem Vorhandensein anderer Stressoren gebildet. Zu diesen zählen Triacylglycerole (TAGs) und Polyhydroxyalkanoate (PHAs) [8]. SL werden in Kompartiment-ähnlichen Strukturen eingelagert. Die Art, welches SL synthetisiert wird, ist organismenspezifisch [9]. In Hefen und anderen eukaryotischen Organismen sind TAGs die primären SL, während in Bakterien und Archaeen die Stoffgruppe PHAs dominierend auftritt und seltener TAG gebildet wird [10].

Da Mikroalgen sowohl in der prokaryotischen als auch in der eukaryotischen Domäne vertreten sind, existieren demnach sowohl TAG- als auch PHA-Produzenten. Neben der Bildung von SL wird ebenfalls die Bildung und Akkumulation von Polysacchariden, wie Stärke (eukaryotische Algen) oder Glykogen (Cyanobakterien) beschrieben [11,12].

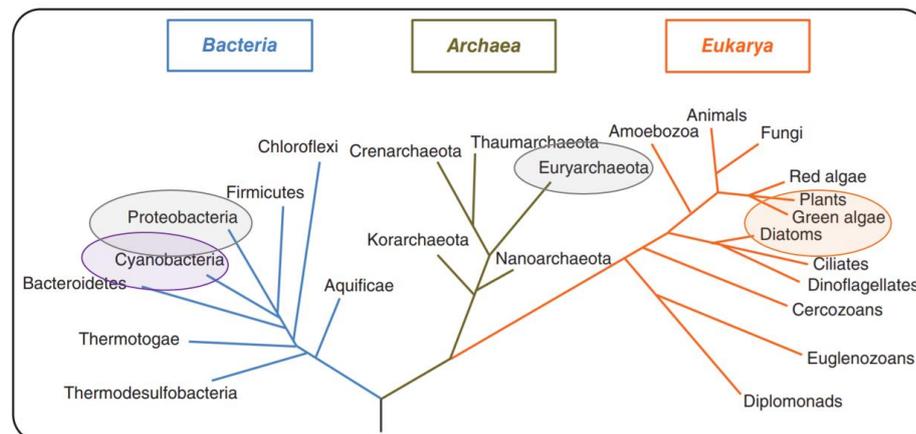


Abb. 1: Speicherlipide in Mikroorganismen. Orange Ellipse: Triacylglycerol-synthetisierende eukaryotische Mikroalgen und Pflanzen. Graue Ellipse: Proteobacteria: bekannte bakterielle Polyhydroxyalkanoat-Bildner. Violette Ellipse: Cyanobakterien (PHA-Produzenten). Abbildung nach Sattley & Madigan 2015 [13].

1.1.1 Biotechnologische Kultivierungsstrategien

Mikroalgen können sowohl unter phototropher, mixotropher und heterotropher Prozessführung kultiviert werden [14,15]. Dabei unterscheiden sich diese in der Energie- und Kohlenstoffquelle (**Tab. 1**). Unabhängig von der Prozessführung können ausbalancierte oder Mangel-induzierte Medienzusammensetzungen eingesetzt werden. Ein einstufiger phototropher Kultivierungsprozess unter Mangelbedingungen ist häufig nicht effektiv, um SL in hohen Konzentration zu bilden [16]. Stattdessen empfiehlt es sich bei den meisten Organismen zuerst die Biomasse bis zur Erreichung der stationären Phase anzuziehen und anschließend die SL-Bildung zu induzieren [17].

Tab. 1: Strategien für die Kultivierung von Mikroalgen [18].

Modus	Energie-Quelle	Kohlenstoff-Quelle	Stoffwechsel-Variabilität
Photo(auto)troph	Licht	CO ₂	nein
Heterotroph	Organisch	Organisch	nein
Mixotroph	Licht + organisch	CO ₂ + organisch	ja

Unter Mangel- oder Stressbedingungen kommt es zu Veränderungen im zellulären Stoffwechsel, die wiederum die Physiologie und Zellmorphologie beeinflussen. Ein Mangel an Makroelementen oder das Vorhandensein von biotischen oder abiotischen Stressfaktoren führt zu einer erhöhten Bildung. Der gestresste Zustand der Kultur kann auch andere physiologische Auswirkungen haben, wie zum Beispiel eine Reduktion der Biomasse, die Bildung von Carotinoiden oder eine Veränderung der Lipid-Zusammensetzung (**Abb. 2**) [19]. Im nächsten Kapitel werden ausgewählte SL-Induktionsstrategien vorgestellt.

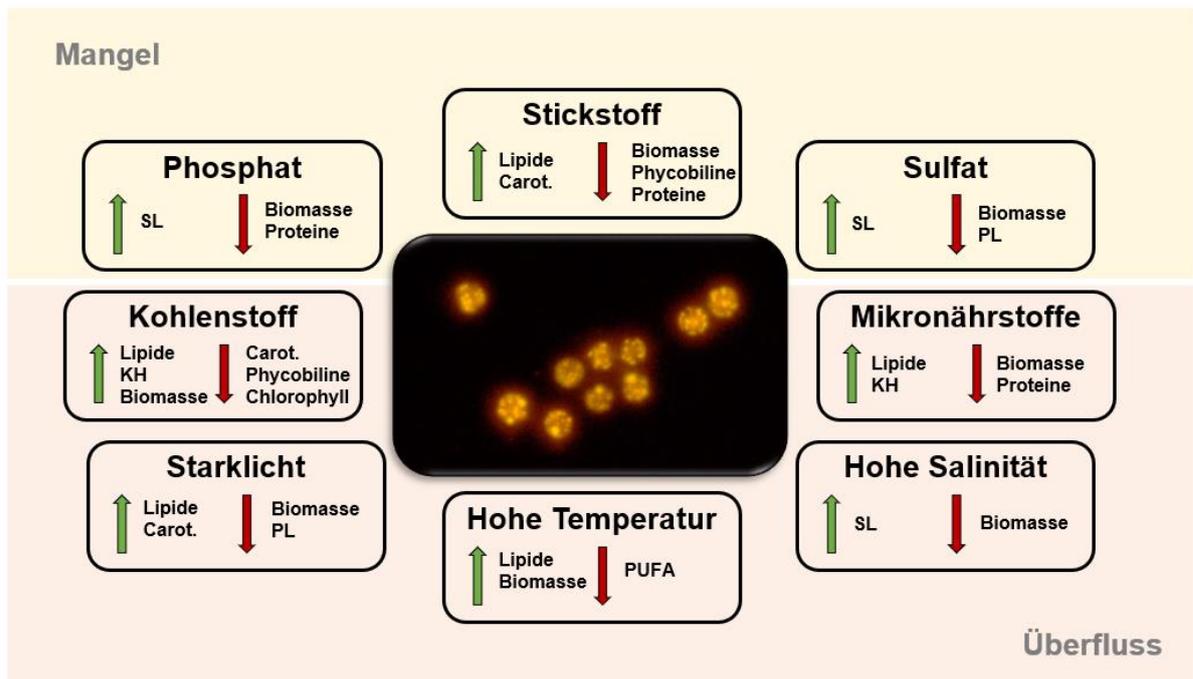


Abb. 2: Einfluss von Mangel- und Überflussbedingungen auf den Metabolismus von Mikroalgen. SL: Speicherlipide, Carot.: Carotinoide, PL: polare Lipide, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Abbildung nach Sun *et al.* 2018 [19].

1.1.2 Speicherlipid-Induktoren

Kohlenstoff-Versorgung

Die Kohlenstoff- (C) Versorgung ist ein essenzieller Faktor, der die Biomasse-Bildung maßgeblich beeinflusst. Unter photoautotrophen Bedingungen wird anorganischer Kohlenstoff (CO_2 , HCO_3^-) durch das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase, RuBisCO) im Chloroplasten (eukaryotische Mikroalgen) oder an der Zellmembran (Cyanobakterien) fixiert [20]. Ein CO_2 -Mangel führt zur Verlangsamung des Stoffwechsels und des Biomasseaufbaus, da die Kohlenstofflimitation unter kontinuierlicher Beleuchtung zu einer Abnahme der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II führt [21]. Die Versorgung von CO_2 ist daher für die Verbesserung der photoautotrophen Lipidproduktion unter Mangelbedingungen entscheidend.

Bei den meisten Mikroalgen führt eine CO₂-Konzentration von 2% - 5% zu einer optimalen Biomasse- und Lipidproduktion [22,23]. Zu hohe CO₂-Konzentrationen (> 10%) können wiederum die Produktivität reduzieren, da dieses den pH-Wert des Mediums senkt [24]. Durch Zugabe organischer Kohlenstoffquellen (Mixotrophie) kann die Biomasse- und Lipidbildung weiter begünstigt werden [25].

Die Zugabe von Acetat, Glucose oder Fructose führt dabei zu einer Überversorgung, welches die SL-Bildung direkt fördert. Dabei wird beispielweise die organische Kohlenstoffquelle Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP, Glykolyse) oder den Entner-Doudoroff-Weg (ED), parallel zur CO₂-Fixierung, assimiliert [26].

Stickstoff-Mangel

Stickstoff (N) ist für die Bildung von Nukleinsäuren (DNA, RNA usw.), Aminosäuren, Proteinen und Chlorophyll essenziell und spielt ferner eine wesentliche Rolle bei der Photosynthese und somit beim Zellwachstum und der Reproduktion. N-Quellen, die durch Mikroalgen metabolisiert werden können, umfassen hauptsächlich Nitrat (NO₃⁻), Ammonium (NH₄⁺) und Harnstoff [27]. Ein Mangel führt zu einer verlangsamten Wachstumsrate, einer verminderten photosynthetischen Effizienz und einer Remobilisierung N-reicher Metabolite, wie Proteinen und Chlorophyll [28]. Beim Abbau der Photosynthese-Pigmente, gehen die Mikroalgen in einen dormanten Zustand über (Chlorose). N-Mangel ist die am häufigsten verwendete Mangelbedingung zur Induktion der SL-Bildung [29]. Dabei resultiert eine begrenzte Stickstoffversorgung in höheren SL-Konzentrationen als die vollständige Abstinenz [30].

Phosphor-Mangel

Phosphor wird intrazellulär hauptsächlich durch Phosphat (PO₄³⁻, P_i) als ein wichtiger Bestandteil von Nukleinsäuren (DNA, RNA), Zellenergieträgern (ATP/ADP/AMP) und dem Membransystem (Phospholipid-Layer) benötigt. P_i spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Proteinregulation (Phosphorylierung und Dephosphorylierung) und dem Zellenergiestoffwechsel. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Triose-P_i, als Produkt des Calvin-Zyklus aus den Chloroplasten durch Triosephosphat-Translocator im Austausch gegen cytosolisches P_i transportiert [31].

Bei P_i-Mangel ist dieser unterbunden, wodurch Triose-P_i in den Chloroplasten akkumuliert und somit die Photosynthese-Leistung reduziert wird. P_i-Mangel begünstigt daher in erster Linie den Kohlenhydrataufbau und fördert somit primär die Stärkeakkumulation [32]. Mit *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp. und *Chlorella* sp konnten unter P_i-Mangel jedoch Lipidgehalte von über 50% nachgewiesen werden [33–35].

Schwermetallstress

Schwermetalle wie Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Magnesium (Mg), Mangan (Mn), Nickel (Ni) oder Zink (Zn), sind in vielen biologischen Prozessen lebenswichtige Mikronährstoffe, da sie für Vitamine, als katalytische Cofaktoren und für Strukturproteine der Zellmembran essenziell sind [36]. Essenzielle Schwermetalle werden in geringeren Konzentrationen in der Spurenelementlösung dem Medium zugeführt. Eine besondere Rolle spielen dabei Fe, Mg und Ca. Die Ionen dieser Metalle haben mehrere physiologische Funktionen, die die Stoffwechselaktivität von Mikroalgenzellen und ihre Lipidakkumulationsprozesse beeinflussen [37–39]. Die Akkumulation hoher Konzentrationen an Metallen kann die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Hemmung der Synthese von Chlorophyll und eine Störung der Zellproliferation verursachen. Dieses führt wiederum zu einer erhöhten Lipidakkumulation als Stressantwort. [19,40].

Osmotischer und oxidativer Stress

Erhöhte Salinität induziert aufgrund des steigenden osmotischen Drucks den physiologischen Stress. In tolerierbaren Bereichen kann damit auch ohne Mangelbedingungen Einfluss auf die SL-Bildung genommen werden. Mit *Chlorella* sp. Oder *Desmodesmus* sp. Konnten durch NaCl-Zugabe bis zu 46 % Lipid-Gehalte erreicht werden [41,42]. Bei der PHA-Bildung beim heterotrophen Bakterium *C. necator* liegt ein vergleichbarer Effekt vor [43]. Neben Schwermetallen können weitere Metabolite, wie H₂O₂ oder Ethanol ROS-Stress hervorbringen. Verschiedene enzymatische antioxidative Fänger wie Katalasen, Ascorbatperoxidase und nicht-enzymatische niedermolekulare Metaboliten wie Prolin und Ascorbinsäure wirken der stressbedingten ROS-Akkumulation entgegen [44].

Bei den Mikroalgen *Dunaliella salina* und *Scenedesmus* sp. Zeigte sich, dass oxidativer Stress Einfluss auf die spezifischen Wachstumsrate und eine erhöhte Lipidakkumulation im Zusammenhang mit der Kultivierungstemperatur darstellte [40,45].

1.2 Polyhydroxyalkanoate

1.2.1 Eigenschaften von Polyhydroxyalkanoaten

PHAs sind Biopolyester, bestehend aus Hydroxy-Fettsäuremonomeren, die erstmals 1925 von Maruice Lemoigne beschrieben wurden [46]. Mittlerweile wurde die Bildung in mehr als 130 Organismen nachgewiesen. PHAs stellen die einzigen Biokunststoffe dar, die vollständig *in vivo* synthetisiert und polymerisiert werden. PHAs zeichnen sich durch eine biologische Abbaubarkeit und Biokompatibilität aus, wodurch sie für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet sind. Diese reichen von der traditionellen Kunststoffindustrie bis hin zur Verwendung als Materialien im biomedizinischen Bereich [47]. PHAs können je nach Monomerlänge in drei Gruppen eingeteilt werden: kurzkettige (scl, C₃-C₅), mittelkettige (mcl, C₆-C₁₆) und langkettige (lcl, >C₁₆). Durch die Polymerisation verschiedener Monomere können ebenfalls Heteropolymere gebildet werden. Das typische Polymergewicht beträgt zwischen 2 · 10⁵ und 3 · 10⁶ Da [48].

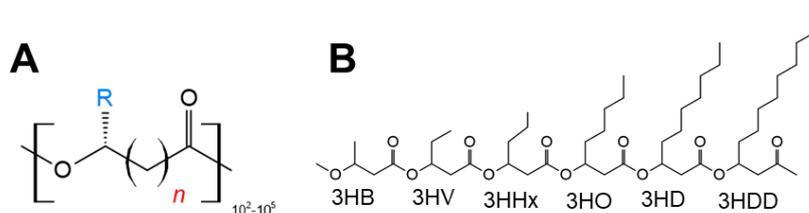


Abb. 3: Allgemeine chemische Struktur von Polyhydroxyalkanoaten (**A**) und verschiedener Vertreter (**B**).
 Monomere: 3HB: 3-Hydroxybutyrat, 3HV: 3-Hydroxyvalerat, 3HHx: 3-Hydroxyhexanoat, 3HO: 3-Hydroxyoctanoat, 3HD: 3-Hydroxydecanoat, 3HDD: 3-hydroxydodecanoat.

PHAs verhalten sich thermoplastisch, wobei die Sprödigkeit mit zunehmender Seitenkettenlänge der Monomere abnimmt. Die Synthese von PHA-Homopolymeren erfolgt durch die Verwendung von geradzahligen Substraten wie Acetat, Glucose oder Fructose. Ungeradzahlige Kohlenstoffverbindungen wie Valerat, Propionat oder Lävulinsäure führen zu Copolymeren wie PHBHV.

Poly-(3-hydroxybutyrat) (P3HB, PHB) ist der am besten untersuchte und am häufigsten vorkommende Vertreter. Isoliertes PHB ist aufgrund seiner linearen Polymerketten kristallin, wasserunlöslich und weist eine geringe O₂-Permeabilität sowie den höchsten Schmelzpunkt aller PHAs auf. Die thermoplastischen Eigenschaften sind allgemein mit denen von Polypropylen vergleichbar (**Tab. 2**) [49].

Tab. 2: Eigenschaften von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) im Vergleich zu Polypropylen (PP). PHB, Poly(3-hydroxybutyrat); PHBHV, Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), mcl, mittelkettig [49–51].

Parameter	PHB	PHBHV	mcl-PHA	PP
Schmelzpunkt T _m [°C]	175	145	40 bis 60	176
Glasübergang T _G [°C]	4	-1	-60 bis -30	-10
Dichte [g cm ⁻³]	1,25	1,20	1,02	0,095
Kristallinität [%]	65-80	56	bis 30	70

1.2.2 Polyhydroxybutyrat-Biosynthese und Aufbau der Granula

Die Biosynthese und die Regulation der PHB-Bildung wurden gut erforscht. PHAs sind Polyester, die aus 3-Hydroxyalkanoat-Coenzym A (CoA) unter Abspaltung des CoA gebildet werden [52]. Die wesentlichen enzymatischen Schritte bestehen aus drei Reaktionen: (i) Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA durch die β-Ketothiolase (PhaA), (ii) Acetoacetyl-CoA wird durch Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert und (iii) die PHA-Polymerase (PhaC) polymerisiert 3-Hydroxybutyryl-CoA-Monomere zu PHB bei gleichzeitiger Freisetzung von CoA (**Abb. 4**).

Der Katabolismus von PHAs wird durch eine geringe ATP-, NADPH- und Acetyl-CoA-Konzentration initiiert. Dabei wird, beginnend mit der Depolymerisation durch die Depolymerase PhaZ, NADH, ATP und Acetyl-CoA über Hydroxybutyrat, Acetoacetat und Acetoacetyl-CoA zurückgewonnen [53].

PhaC stellt das Schlüsselenzym der PHA-Biosynthese dar. Basierend auf der quartären Protein-Struktur und Substratazeptanz kann PhaC in vier Klassen (PhaC^{I-IV}) unterteilt werden [54]. PhaC^I, PhaC^{III} und PhaC^{IV} synthetisieren vornehmlich scl-PHA, während PhaC^{II} in Abhängigkeit vom Substrat mcl- und lcl-PHAs synthetisieren kann [55]. PhaC^I und PhaC^{II} bestehen aus einem Proteinhomodimer (PhaC) von jeweils ca. 60 kDa. PhaC^{III} besteht aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen Untereinheit PhaC (40–53 kDa) und einer zweiten katalytisch nicht-aktiven (PhaE, 20 bis 40 kDa). PhaC^{IV} wurde bislang nur in *Bacillus* sp. beschrieben und besteht ähnlich wie PhaC^{III} aus den zwei Untereinheiten PhaC (42 kDa) und PhaR (22 kDa) [56].

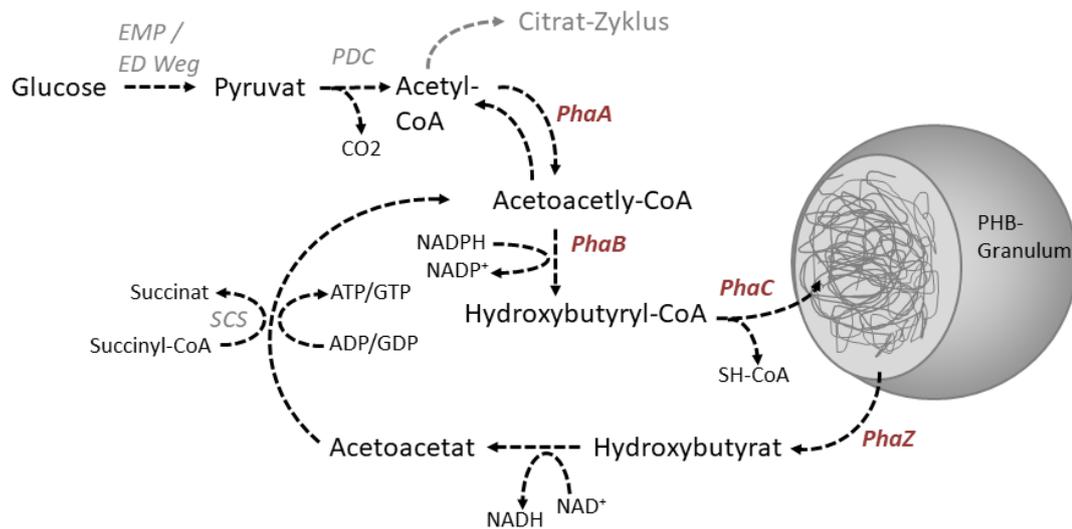


Abb. 4: Zyklus der PHB-Biosynthese. Enzyme: PhaA: β -Ketothiolase, PhaB: Acetoacetyl-CoA-Reduktase, PhaC: PHB-Synthase, PhaZ: PHB-Depolymerase(n) PDC: Pyruvatdehydrogenase-Komplex, SCS: Succinyl-CoA-Synthetase. Pathways: EMP: Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse), ED: Entner-Doudoroff-Weg. Abbildung nach [57,58]

PHAs werden in cytoplasmatischen Granula akkumuliert, die einen Durchmesser von 100 – 500 nm und ein Molekulargewicht von 200 - 300 kDa aufweisen [59]. PhaC ist ein integraler Bestandteil der komplexen Granula-Oberfläche, zu der auch mehrere Strukturproteine (Phasine) und PhaZ gehören. Nach aktuellem Kenntnisstand bestehen die Organellen-ähnliche Granula aus einem Proteinmantel [60,61].

1.2.3 Organismen und industrielle Relevanz

Die Herstellung von PHAs und deren Verwendung in Produkten steckt noch in den Anfängen. Dennoch zählen die Produktionskapazitäten im Vergleich zu anderen Biopolymeren zu den am schnellsten wachsenden Bereichen der Biotechnologie [62]. Die Produktion ist aufgrund der biotechnologischen Synthese mit hohen Kosten verbunden, was es schwierig macht, im Preis mit erdölbasierten Kunststoffen zu konkurrieren. Die Kosten stellen nach wie vor die größte Herausforderung für die Kommerzialisierung in den traditionellen Polymer-Anwendungsbereichen dar.

In den Vereinigten Staaten (zum Beispiel bei Newlight Technologies mit einer jährlichen Produktion von 23.000 Tonnen), China (beispielsweise Tianjin GreenBio Materials mit einer jährlichen Produktion von 10.000 Tonnen) und Europa (Nafigate in Tschechien) befinden sich PHA-Produktionsstätten. Der Preis hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Maßstab, der Art des Substrats, dem Bakterienstamm und der Wahl des Downstream-Processings. Die Produktionskosten belaufen sich auf etwa 4-5 € kg⁻¹ bei Verwendung von *C. necator* [63]. Im Vergleich dazu liegen die Kosten für Polypropylen bei ca. 1,2 € kg⁻¹ (Stand: 02/2023, [64]).

Die bekanntesten und industriell am häufigsten verwendeten PHA-Produzenten sind *Burkholderia* sp., *C. necator*, *Alcaligenes latus* und *Escherichia coli* (rekombinant), welche intrazelluläre PHA-Gehalte von über 70% des Gesamtgewichts aufweisen [65]. Das gramnegative Knallgasbakterium *C. necator* aus der Familie der *Burkholderiaceae* besitzt sowohl heterotrophe als auch litoautotrophe Stoffwechselaktivitäten und kann CO₂, organischen Verbindungen und H₂ als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle nutzen [66]. Daher ist *C. necator* gut an Veränderungen der Umwelt angepasst und kann viele Kohlenhydrat-Arten, organische Säuren oder Alkoholen für Wachstum und PHB-Bildung nutzen [67]. Infolge seiner Flexibilität ist *C. necator* ein Modellorganismus der PHB-Biosynthese und wird daher in dieser Arbeit bei der Entwicklung und Validierung der Fluoreszenzmethode verwendet.

1.2.4 Polyhydroxybutyrat-Bildung in Cyanobakterien

Die PHB-Synthese in Cyanobakterien konnte in mehreren phylogenetischen Ordnungen gezeigt werden [68,69]. Bislang wurde nur die Synthese PhaC^{III} bei Cyanobakterien nachgewiesen, wonach diese nur zur Bildung von scl-PHA befähigt sind [70]. Im Vergleich zu heterotrophen Bakterien, produzieren Cyanobakterien wesentlich geringere Mengen PHB und bilden mit Glykogen einen weiteren Kohlenstoffspeicher aus [28]. Neben der Funktion als SL sind PHB-Granula auch in der Stress-Resistenz und in der Regulation des Redoxstatus involviert und fungieren daher, anders als bei heterotrophen Bakterien, nicht nur als primäres SL [12,71].

Wie mehrere Untersuchungen an *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigten, wird PHB zu einem Teil aus dem Glykogen-Pool gebildet, der sich unter phototrophen Mangelbedingungen aufbaut [11,28,72]. Daher ist die PHA-Bildung ebenfalls unter phototrophen ausbalancierten Kultivierungsbedingungen nur gering [73]. Während N-Mangels geht der Metabolismus in einen dormanten Zustand über. Dieses ist gekennzeichnet durch eine verminderte Photosyntheseaktivität, die mit einer reduzierten Synthese von ATP einhergeht (**Abb. 5**) [74]. Wie Studien gezeigt haben, stellt Glykogen in Cyanobakterien den wichtigsten Kohlenstoff- und Energiespeicher unter Nährstofflimitierung dar [28,75]. Während die Bildung von Glykogen aus Glucose-6P_i erfolgt, dient Acetyl-CoA als Ausgangsmolekül für die PHB-Synthese [76]. Dies deutet darauf hin, dass Glykogen einen reaktionsschneller Energie- und Kohlenstoffspeicher darstellt, da das Spaltprodukt Glucose-1P_i direkt über ED, oder EMP wieder verstoffwechselt werden kann. Acetyl-CoA hingegen dient als Baustein für verschiedene anabole Reaktionen, sowie als wichtiger Precursor für den Citratzyklus.

Maximale PHA-Konzentrationen konnten bei *Synechococcus* sp. MA19 unter P_i-Mangel (55%) oder *Synechocystis* sp. PCC6803 unter N- und P_i-Mangel (16%) sowie 15% bei *Spirulina subsalsa* unter N-Mangel erreicht werden [77–79]. Höhere Bildungsraten konnten im Vergleich zur reinen phototrophen Kultivierung durch mixotrophe Strategien erzielt werden [80]. Wiederum zeigten anderen Studien, dass unter Gasaustausch-limitierten chemoheterotrophen Bedingungen, hohe Gehalte bei *Nostoc muscorum* (46%) und bei *Aulosira fertilissima* (49%) erreicht werden konnten [81].

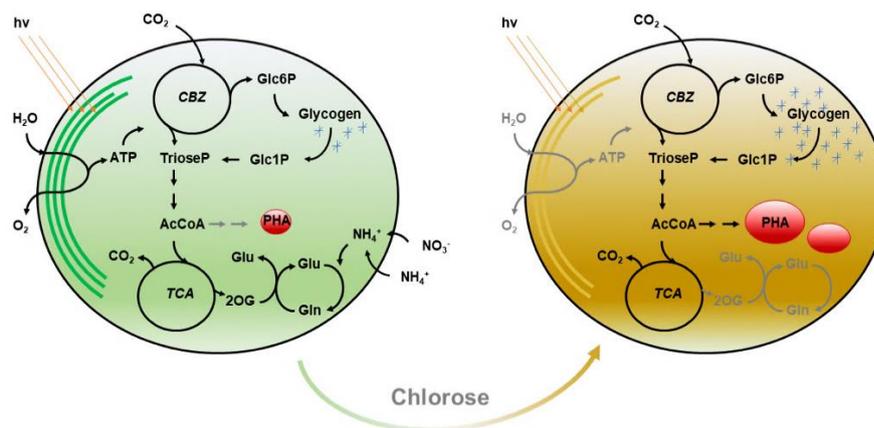


Abb. 5: Schematische Darstellung der PHB-Bildung in Cyanobakterien beim Übergang vom vegetativen Lebenszyklus (**links**) zum dormanten Zustand unter Stickstoffmangel (**rechts**). Assoziierte Stoffwechselwege sind verkürzt, herunter regulierte Stoffwechselwege sind grau dargestellt. Abkürzungen: 2OG, 2-Oxoglutarinsäure; AcCoA, Acetyl-CoenzymA; ATP, Adenosintri-phosphat; CBZ, Calvin-Benson-Zyklus; CO₂, Kohlenstoffdioxid; Glc1P, Glucose-1-Phosphat; Glc6P, Glucose-6-Phosphat; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat; H₂O, Wasser; hv, Licht; NH₄⁺, Ammonium; NO₃⁻, Nitrat; O₂, Sauerstoff; PHA, Polyhydroxyalkanoate; TCA, Tricarbonsäurezyklus; TrioseP, Triose-Phosphat. Grau: runter regulierte Stoffwechselwege. Abbildung angelehnt an Klotz *et al.* 2016 und Koch *et al.* 2019 [72,75].

Während die meisten Studien die PHB-Bildung in unizellularen Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC6803 der Ordnung *Synechococcales* durchgeführt wurden, gibt es nur wenige Studien, die die SL-Bildung und Zusammensetzung von filamentösen Cyanobakterien adressieren. Die filamentösen Vertreter der Ordnung *Synechococcales*, einschließlich der Gattung *Leptolyngbya* sp. bilden Filamente unterschiedlicher Länge aus undifferenzierten Zellen und zeichnen sich durch das Fehlen von Heterozysten (N₂-Fixierung) und Akineten (Überdauerungszellen) aus. Dadurch sind sie einerseits für die technische Kultivierung gut geeignet und andererseits für die Untersuchung der Mangel-induzierten SL-Synthese präferiert [82,83].

So konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen an PHB in *L. valderiana* gebildet wurde [84]. Rueda *et al.* beschrieben die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. enthaltenden mikrobiellen Konsortien, die bis zu 5 % PHB akkumulierten [11]. Wiederum beschrieben andere Studien *Leptolyngbya* sp. mit hohem intrazellularen Lipidgehalt und daher einer potenziellen Eignung für die photobiotechnologische Lipid-Produktion [85,86].

Auf Grund dieser Studien, stellt ein wesentlicher Aspekt in dieser Arbeit die Untersuchung des PHB-Bildungsprozesses und der Biomassezusammensetzung in *Leptolyngbya* sp. dar.

1.3 Triacylglycerol-Bildung in Mikroalgen

In eukaryotischen Mikroalgen liegt gattungsübergreifend die Bildung von TAGs zur Speicherung von Energie und Kohlenstoff vor [87]. TAGs sind dreifach mit Fettsäuren veresterte Glycerole, wovon mehr als 90 % ungesättigt sind und eine Kettenlänge von C₁₄ - C₂₀ aufweisen. Die in TAG am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind C_{16:0} (Palmitinsäure) und C_{18:1} (Ölsäure) [88]. Industrielle Anwendungsmöglichkeiten finden sich beispielsweise im Bereich der Kosmetik (z.B. Öle) sowie in der Kraftstoffindustrie als Ausgangsstoffe für Biodiesel [89]. Anders als in Pflanzen, wo Lipide in definierten Zellen, Gewebe oder Organen synthetisiert werden, findet der vollständige Lipid-Metabolismus beginnend mit der CO₂-Fixierung bis hin zur und Sequestrierung innerhalb einer einzelnen Algenzelle statt. Die Anreicherung erfolgt in dicht gepackten Organellen-ähnlichen Lipidkörpern (**Abb. 6**) [6,90].

Bei Mikroalgen sind unter nährstoffreichen Bedingungen normalerweise ein oder zwei Lipidkörper pro Zelle vorhanden. Sowohl die Anzahl als auch die Größe nehmen bei Stress zu. Dieser Prozess wird von einem Abbau der Membranlipide begleitet [91].

Die Struktur der Lipidkörper besteht aus einem neutralen Lipidkern (in der Regel TAGs). Dieser ist ummantelt von einer Monolayer polarer Lipide. Massenspektroskopische Analysen bestätigen, dass mehrere Strukturproteine im Aufbau der Lipidkörperoberfläche involviert sind. Dazu gehören Oleosine und Major Lipid Tröpfchenproteine [92,93]. Dieser Aufbau wurde ursprünglich für Maiskörner beschrieben, scheint aber für Lipidkörper ubiquitär zu gelten [94]. Damit unterscheidet sich der Aufbau und die Zusammensetzung der Lipidkörper zu PHA-Granula, welche aus Proteinen ummantelt sind und im Kern Polyester akkumulieren (**Abb. 4**).

Die Lipidbildung unterliegt einer vierstufigen Biosynthese: (I) Synthese von Acetyl-CoA und NAD(P)H im Chloroplasten, (II) Biosynthese der Fettsäurealkylketten, (III) Einteilung der Alkylketten zu dem Polar- oder Neutrallipidpool und (IV) die eigentliche Lipidkörper-Biosynthese am Endoplasmatischem Retikulum (ER) und anschließender Einlagerung in den Lipidkörpern [10]. Demnach finden enzymatische Reaktionen in zwei Kompartimenten und im Cytosol statt. Chloroplasten spielen dabei eine Schlüsselrolle in der *de novo* Fettsäurebiosynthese.

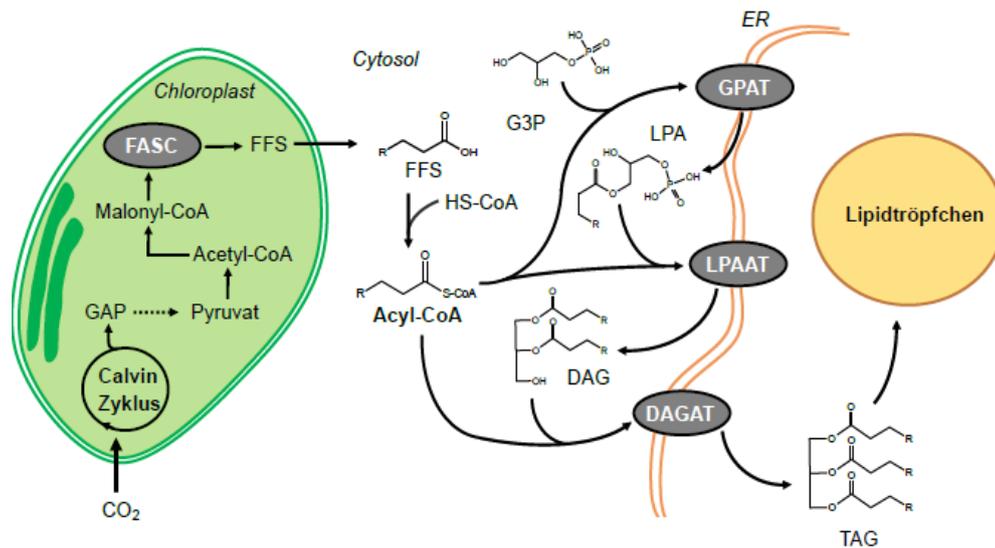


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der Triacylglycerol-Biosynthese in Mikroalgen. Metabolite: CoA, Coenzym A; DAG, Diacylglycerol; FFS, Freie Fettsäuren; G3P, Glycerol-3-Phosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-phosphat; LPA, Lysophosphatidsäure; TAG, Triacylglycerol; Enzyme: DAGAT, DAG-Acyl-Transferase; FASC, Fettsäure-Synthase-Komplex; GPAT, G3P-Acyl-Transferase; LPAAT, LPA-Acyl-Transferase. Abbildung angelehnt an Garay et al. 2014 [10].

In Prokaryoten unterscheidet sich die TAG-Biosynthese dahingehend, dass diese durch die Wachsester-Synthase / Diacylglycerol-Acyltransferase (WS/DGAT) direkt an der Zellmembran katalysiert wird [95]. Die Diacylglycerol-O-Acyltransferase (DGAT) stellt das Schlüsselenzym der TAG-Biosynthese und gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dar. In Pflanzen und Mikroalgen ist Typ-II dominant [96].

TAGs und polare Lipide können dabei bis zu 90 % des Gesamtgewichts der Zelle ausmachen [93]. Hohe intrazelluläre Lipidgehalte in Mikroalgen konnten in *Dunaliella sp.* (23%), *Chlorella sp.* (31%), *Neochloris sp.* (54%), *Nannochloropsis sp.* (68%) oder *Phaeodactylum sp.* (30%) gemessen werden [97]. Dabei sind lipidreiche Mikroalgen in allen Ordnungen vertreten und damit nicht auf eine spezifische Ordnung oder Organismen beschränkt. Als interessante Kandidaten für skalierbare Anwendungen im Photobioreaktor erwiesen sich *Stichococcus sp.* (Chlorophyta), *Nannochloropsis sp.* (Heterokontophyta) und *Porphyridium sp.* (Rhodophyta) [98–100]. Diese besitzen nicht nur das Potenzial hohe Biomasse- und Lipidkonzentrationen zu bilden, sondern weisen auch ein sehr unterschiedliches Lipidprofil auf. Vertreter aus diesen drei Ordnungen werden daher in dieser Arbeit untersucht.

1.4 Bestimmung von Polyhydroxyalkanoaten und Triacylglycerole

Der Nachweis von PHB-Granula mittels des Farbstoffs Sudan Black ist eine weitverbreitete Technik, um PHB in Bakterien sichtbar zu machen [101]. Dank der charakteristischen tiefblauen bis schwarzen Koloniefärbung können PHA-Produzenten makroskopisch mittels Mikroskop identifiziert werden [102]. Eine weitere Möglichkeit des Kolonie-Screenings ist die Zugabe von fluoreszierenden Farbstoffen wie Nile blue, Nile red oder BODIPY-Derivate [103–105]. Auf genetischer Ebene kann das kodierende Gen der PhaC mittels PCR nachgewiesen werden [106].

Der photometrische Crotonsäure-Assay eignet sich als schnelle und leicht umsetzbare Methode, um PHB zu quantifizieren [107]. Durch Hydrolyse von PHB in konzentrierter Schwefelsäure wird es in Crotonsäure-Monomere fragmentiert, welche stark im UV-Bereich absorbiert [108]. Allerdings kann es zu einer Überschätzung der eigentlichen Konzentration kommen, da weitere Substanzen ebenfalls im UV-Bereich Licht absorbieren können. Zudem ist die Methode nur auf PHB beschränkt, da die Spaltprodukte von langkettigen PHAs kein oder ein sehr schwaches Absorptionsvermögen aufweisen [109]. Aus diesem Grund haben sich chromatographische Methoden als effiziente Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung mikrobieller PHAs durchgesetzt [110].

Durch die hohe Automatisierung bei der Probenanalyse und Separierung von Analyten hat sich die GC als Referenzsystem etabliert [110,111]. Die Kopplung von GC mit Massenspektrometern (GC-MS) eröffnet zudem die Möglichkeit, neue PHA zu identifizieren, abseits der Routineanalytik [112]. Hierbei zeigen PHA-Monomere mit einer Kohlenstoffzahl zwischen C₄ - C₁₆ eine starke lineare Korrelation mit den Retentionszeiten, was die Vorhersage anderer PHA-Monomere ermöglicht [113]. Diese Methode kann somit bei der Detektion unbekannter PHA und bei Monomeren, für die keine analytischen Referenzsubstanzen erhältlich sind, eingesetzt werden. Allerdings ist die GC aufgrund der zeitintensiven Probenvorbereitung mit einem großen Nachteil verbunden.

Bei der GC-Messung müssen PHAs hydrolysiert und die Monomere verestert werden, während bei LC-Chromatographie die Hydrolyse-Produkte direkt gemessen werden können. Hierfür werden die Spaltprodukte durch eine HPLC getrennt und analysiert, was eine höhere Genauigkeit gegenüber dem photometrischen Crotonsäure-Assay bietet. Jedoch kann damit, wie bei dem Crotonsäure-Assay ebenfalls nur die Spaltprodukte des PHBs detektiert werden.

Mit einer basisch-katalysierten Esterhydrolyse kann zudem auch HV gemessen werden. Im Gegensatz zur sauren Hydrolyse, resultieren nach dem basischen Aufschluss die Spaltprodukte Crotonsäure und 2-Pentensäure, welche beide im UV-Bereich gemessen werden können [110].

Bei der Eliminierungsreaktion entzieht das Hydroxid dem Polymer-Grundgerüst ein Proton wodurch die entstehende Doppelbindung im UV-Bereich gemessen werden kann [114]. Der basische Aufschluss geht jedoch mit einer geringen Aufschlussrate einher, welches bei Proben mit geringem PHA-Anteil beachtet werden muss.

Neben den chromatographischen Verfahren können auch spektroskopische Methoden wie FTIR eingesetzt werden, um PHAs qualitativ und quantitativ zu bestimmen [115,116]. FTIR besitzt wesentliche Vorteile wie eine geringe Probenvorbereitung und eine nicht destruktive Messung. Allerdings gestaltet sich die Differenzierung und Quantifizierung von verschiedenen PHA-Vertretern aus der Biomasse heraus als sehr fehleranfällig, da die Schwingungsmuster der PHAs mit anderen zellulären Strukturen überlagert werden können [117]. Daher eignet sich FTIR hauptsächlich zur Untersuchung des extrahierten Produktes.

Die Möglichkeiten zur Messung von TAG/Lipid ähneln sich in ihrem Spektrum. Eine photometrische Messung (z.B. SPV-Assay) ermöglicht die Bestimmung des Gesamtlipid-Gehalts [118]. Ebenso ist die gravimetrische Extraktion mittels der Blight-Dyer-Methode weitverbreitet [119]. Anschließend kann der Lipidextrakt durch Dünnschichtchromatographie oder HPLC in die einzelnen Lipidgruppen aufgetrennt und analysiert werden [31,120,121].

Aufgrund der Vielfalt an veresterten Fettsäuren in TAGs ist die FAME-Bestimmung mittels GC-Messungen eine bedeutende Methode [122]. Allerdings ist allein die Bestimmung der FAME nicht ausreichend aussagekräftig, da der Zusammenhang zum Lipidgehalt berücksichtigt werden muss. Zur Bestimmung der Lipidklassen kann HPLC eingesetzt werden [120]. Auch FTIR wurde zum Monitoring des Lipidgehalts genutzt, indem die $\text{CH}_3 / \text{CH}_2$ -Schwingungen zwischen 2800 cm^{-1} und 3000 cm^{-1} für die Analyse berücksichtigt wurden [123].

Chromatographische Methoden wie HPLC und GC gelten nach wie vor als Goldstandard für die Bestimmung von SL. Diese Verfahren zeichnen sich durch eine hohe Präzision aus. Allerdings eignen sie diese nicht für eine unmittelbare Analyse während des Kultivierungsprozesses, da die Probenverarbeitung und, im Vergleich zu spektroskopischen Methoden, lange Messzeit eine zeitnahe Detektion erschwert.

Einleitung

Tab. 3: Methodische Auswahl der Speicherlipidbestimmung. Abkürzungen: CARS, Kohärent Anti-Stokes Raman Scattering; GC, Gaschromatographie; LC, Flüssigchromatographie; PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion; PHA, Polyhydroxyalkanoate; TLC, Dünnschichtchromatographie.

Methodik	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Ref.
PCR	Detektion von <i>phaC</i> im DNA-Isolat durch spezifische Primer	Geringe Probenmenge, hoher Durchsatz	Primer unspezifisch für verschiedene <i>phaC</i> -Klassen	[106]
Gravimetrie	Extraktion Lösungsmittel	mit Direkte Bestimmung der Produkte, Folgeanalytik möglich	zeitaufwendig	[119,124]
Fluoreszenz-Mikroskopie	Visualisierung SL-Granula durch Farbstoffzugabe	Nicht destruktiv, geringe Probenmenge nötig	Nicht quantitativ	[105,125,126]
Mikroskopie	Zugabe von geeigneten Farbstoffen	Schnell, Visualisierung, Probenmenge	direkte Geringe Nicht quantitativ	[102]
CARS	Strukturabbildung charakteristischer Schwingungskontraste	Visualisierung Einfärbung	ohne Anschaffung, Komplexität	[127]
GC	Messung der umgeesterten Hydrolyseprodukte. Detektion über FID oder MS	hohe Auflösung, Quali- und Quantifizierung	Destruktiv, indirekte Bestimmung, zeitaufwendig	[112,122]
LC	Messung der Hydrolyseprodukte. Detektion über UV oder ELSD	hohe Auflösung, Quali- und Quantifizierung	Destruktiv, indirekte Bestimmung. Bei PHA: nur scl-PHA detektierbar	[109,110,120]
TLC	Trennung über DC-Platten nach Proben-Aufschluss	Fraktionierung Lipidklassen Folgeanalytik	der für Detektion schwierig, hohe Probenmenge	[121]
Photometrie	Aufschluss in Säure, Detektion im UV-Bereich. SPV-Assay für Lipide	Einfache Handhabung, Hochdurchsatz möglich	Nicht selektiv, Überschätzung der Konzentration möglich	[107,118]
Fluoreszenz	Messung Fluoreszenz durch Farbstoffzugabe	Nicht destruktiv, geringe Probenmenge nötig	Indirekte Messung, Genauigkeit abhängig von zahlreichen Faktoren	[126,128,129]
FTIR	Analyse der Schwingungsmuster zwischen 400-4000 cm ⁻¹	Schnelle Durchführung	Differenzierung schwierig bei Biomasse-Proben	[121]

1.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Lumineszenz ist die Abgabe von elektromagnetischer Strahlung bei angeregten Zuständen von Molekülen. Sie wird in zwei Kategorien, Fluoreszenz und Phosphoreszenz, unterteilt, je nach Art des angeregten Zustands [130]. Bei der Fluoreszenz befindet sich das angeregte Elektron im Singulett-Zustand in Paarung mit einem Elektron im Grundzustand (S₀). Infolgedessen erfolgt die Rückkehr in den Grundzustand schnell durch Emission von Photonen. Im Allgemeinen beträgt die Emissionsrate der Fluoreszenz 10^8 s^{-1} , wodurch die typische Fluoreszenzlebensdauer ungefähr 10 ns beträgt [130].

Die Verschiebung der Wellenlänge von der Anregung zur Abstrahlung, auch bekannt als Stokes-Shift, beträgt bei vielen Molekülen mit konjugierten Doppelbindungen etwa 20 - 50 nm [131]. Besonders bei Photosynthese-assoziierten Pigmenten wie Chlorophyllen, Phycobilinen und Carotinoiden in Mikroalgen ist ein Fluoreszenzverhalten zu beobachten [132]. Im Vergleich zu photometrischen Methoden bietet die Fluoreszenzmessung den Vorteil, dass sie mit der Biomasse-Suspension durchgeführt werden kann, ohne dass eine Extraktion der Metabolite erforderlich ist [133]. Zudem ermöglicht das photochemische Dogma (Kasha-Vavilov-Regel) die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Metabolite aufgrund der spezifischen Anregungs- und Emissionsbanden, die unabhängig voneinander sind [134].

1.5.1 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von Speicherlipiden in Mikroalgen

SL, die keine Eigenfluoreszenz aufweisen, müssen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, um sie mithilfe von Fluoreszenz detektieren zu können (extrinsische Fluoreszenz). Diese Methode ist in der zellbiologischen Analyse und Diagnostik unverzichtbar geworden, was zur Entwicklung einer Vielzahl spezifischer Fluoreszenz-Sonden geführt hat [135]. Um PHAs und TAGs mithilfe von Fluoreszenz nachzuweisen, haben sich mehrere lipophile Farbstoffe als geeignet erwiesen. Der am besten untersuchte und am häufigsten angewandte Marker ist Nile red (9-Diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazin-5-on; NR), welches eine leuchtend gelbe bis rote Fluoreszenz aufweist [129,136,137]. Daher fand NR Anwendung bei der Bestimmung von PHB und Lipiden/TAGs in zahlreichen Mikroalgen (**Tab. 4**).

Dabei ist die Anzahl an Studien der PHB-Bestimmungen wesentlich geringer als bei TAGs. Die SL-Bestimmung wurde sowohl in herkömmlichen Fluoreszenzspektrometern als auch auf Einzelzellbasis durch Einsatz von Durchflusszytometrie (DCM) durchgeführt.

NR ist ein polaritätsempfindlicher solvatochromer Farbstoff, der sich durch eine bathochrome Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlängen bei steigender Polarität auszeichnet [138]. Infolgedessen nimmt das Maximum der Emissionswellenlänge ab, wenn die Farbstoffmoleküle in lipophilen PHA-Granula oder Lipidkörpern eingelagert werden. Aufgrund der Solvatochromie wurde NR ebenso genutzt, um eine Differenzierung von unterschiedlichen PHAs vorzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Wellenlänge von 10 - 25 nm in Abhängigkeit von der PHA-Monomerzusammensetzung auftrat [104]. Darüber hinaus verwendeten Diaz *et al.* das Verhältnis von orangefarbener und roter NR-Fluoreszenz zur Unterscheidung von polaren und unpolaren Lipiden in Swiss 3T3 Fibroblasten mittels mikroskopischer Bildauswertung [139]. Dennoch weist NR auch mehrere Limitationen auf, wie unspezifische Markierungen oder konzentrationsbedingte Anomalien, welche die Erstellung einer reproduzierbaren und stabilen Messung erschweren [140].

Eine mögliche Alternative zu NR sind BODIPY-Farbstoffe (Bor-Dipyrrromethan-Fluoreszenzfarbstoffe). Diese besitzen eine gute Zellpermeation, eine hohe Quantenausbeute und eine hohe Affinität zu lipophilen Substanzen [128,133]. Im Gegensatz zu NR weisen BODIPY-Farbstoffe eine geringe Stokes-Verschiebung auf und emittieren im grünen Spektralbereich (**Abb. 7**) [128]. Eine erfolgreiche Verwendung des unpolaren BODIPY-Derivats BODIPY^{493/503} (4,4-Difluor-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen, BY) zur spezifischen Markierung wurde bereits für PHAs und TAGs nachgewiesen [141,142]. Allerdings besitzen BODIPY-Farbstoffe aufgrund ihrer fehlenden Solvatochromie eine hohe Hintergrundfluoreszenz [141,143]. Wie dargestellt konnten Nile red als auch BODIPY-Farbstoffe erfolgreich bei der Bestimmung von verschiedenen PHAs in heterotrophen Organismen, wie *C. necator* eingesetzt werden [104]. Die Methodik der Fluoreszenzdetektion war sowohl für gramnegative Bakterien (wie *C. necator* oder *Pseudomonas* sp.) als auch für grampositive Bakterien (wie *Bacillus*) zur Bestimmung von PHAs erfolgreich einsetzbar. Ferner wurde auch bei Mikroalgen eine Ordnungs-übergreifende Markierung von Lipidkörpern mittels Fluoreszenzmarkierung erfolgreich angewandt (**Tab. 4**). Mikroalgen präsentieren unterschiedliche Zellwandstrukturen.

Rhodophyta (z.B. *Porphyridium* sp.) besitzen Zellmembranen, die gram-negativen Bakterien ähneln, während Grünalgen (wie *Chlorella* sp. oder *Stichococcus* sp.) und Heterokontophyta (wie *Nannochloropsis* sp.) zusätzliche Cellulosefilamente ausbilden, die ihre Zellwände widerstandsfähiger gegen äußere Einflüsse machen [144,145]. Obwohl die Lipidkörper in eukaryotischen Mikroalgen erfolgreich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden konnten, variiert die Diffusion der Farbstoffe durch die Zellwand je nach Organismus, was bei der Entwicklung von Färbetechniken berücksichtigt werden muss [125].

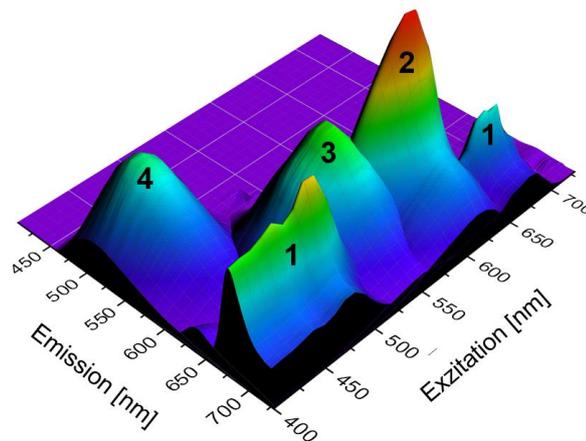


Abb. 7: Fluoreszenz Exzitations-Emissions-Spektren von Chlorophyll a (1), Phycocyanin (2), -Granula-Nile red Fluoreszenz in Polyhydroxybutyrat (PHB) (3) und BODIPY^{493/503} Fluoreszenz in PHB (4). Erstellt mit OriginPro.

Für die Markierung von SL in Mikroalgen bietet sich der vielversprechende Farbstoff LipidGreen2 (LG2) an. LG2 ist ein Derivat von LipidGreen(1), welches bereits erfolgreich zur gezielten Färbung von Lipidkörpern in Zelllinien sowie zur PHB-Bestimmung in *Escherichia coli* eingesetzt wurde [146,147]. Die Eignung von LG2 zur Visualisierung von lipophilen Substanzen wurde durch die selektive Anfärbung von Fettreserven in Zebrafischen bestätigt [148]. Im Gegensatz zu Rot-emittierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie NR, die im Emissionsbereich intrinsischer Fluorophore von Mikroalgen liegen, emittieren blaue oder grüne Fluoreszenzfarbstoffe wie LG2 und BY außerhalb dieses Bereichs und eignen sich daher besser zur Bestimmung von SL in Mikroalgen (**Abb. 7**). Aufgrund der beschriebenen hohen Sensitivität und Affinität zu lipophilen Strukturen wird LG2 in dieser Arbeit als Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung und Detektion von SL in Mikroalgen untersucht.

Tab. 4: Fluorometrische Speicherlipidmessung mit Nile red und BODIPY-Farbstoffen in Mikroalgen. Abkürzungen: BY, BODIPY; DMSO, Dimethylsulfoxid; FACS, Fluorescence-Activated-Cell-Sorting; FAME, Fettsäuremethyl-ester; FCS, Fluoreszenzspektrometer; DCM, Durchflusszytometrie; K.A., keine Angabe; NR, Nile red; PHB, Polyhydroxybutyrat; SL, Speicherlipidtyp, TAG, Triacylglycerole.

Phylum	Spezies	SL	System	NR	BY	Carrier	Korr.	Ref.
Bacillariophyta	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	TAG	FCS		x	DMSO	0,987	[149]
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	TAG	FCS	x		DMSO	0,990	[149]
Chlorophyta	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	k.A.	FCS	x		Ethanol	0,890	[150]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	FAME	DCM	x		Glycerol/	k.A.	[151]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	FAME	DCM	x		DMSO	k.A.	[151]
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Lipide	FCS	x		DMSO	0,990	[152]
	<i>Chlorella sp.</i>	TAG	DCM		x	k.A.	k.A.	[153]
	<i>Dunaliella primolecta</i>	Lipide	FCS	x		DMSO	k.A.	[154]
	<i>Dunaliella salina</i>	FAME	DCM	x		Aceton	0,90	[155]
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Lipide	DCM	x		Aceton/	0,990	[128]
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Lipide	FCS	x		Aceton	0,950	[152]
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Lipide	FCS	x		Aceton / Ultraschallhall/	k.A.	[156]
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	TAG	FCS		x	DMSO	0,9349	[149]
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	TAG	FCS	x		DMSO	0,908	[149]
	<i>Tetraselmis suecica</i>	Lipide	FCS	x		DMSO / EDTA	k.A.	[157]
	<i>Tetraselmis suecica</i>	k.A.	DCM	x		Aceton	k.A.	[158]
	Cyanobacteria	<i>Nodularia sp.</i>	PHB	Mikroskop		x	DMSO	k.A.
<i>Nodularia sp.</i>		PHB	Mikroskop	x		DMSO	k.A.	[159]
<i>Synechocystis sp.</i>		PHB	DCM	x		DMSO	0,980	[160]
<i>Synechocystis sp.</i>		PHB	FCS	x		Ethanol	k.A.	[161]
<i>Synechocystis sp.</i>		PHB	Mikroskop		x	DMSO	k.A.	[159]
<i>Synechocystis sp.</i>		PHB	Mikroskop	x		DMSO	k.A.	[159]
Haptophyta	<i>Isochrysis galbana</i>	FAME	DCM	x		Glutaraldehyd	0,8	[162]
Miozoa	<i>Prorocentrum micans</i>	TAG	FCS		x	DMSO	0,972	[163]
	<i>Prorocentrum micans</i>	TAG	FCS	x		DMSO	0,989	[163]

Phylum	Spezies	SL	System	NR	BY	Carrier	Korr.	Ref.
Haptophyta	<i>Isochrysis galbana</i>	FAME	DCM	x		Glutaraldehyd	0,8	[162]
Miozoa	<i>Prorocentrum micans</i>	TAG	FCS		x	DMSO	0,972	[163]
	<i>Prorocentrum micans</i>	TAG	FCS	x		DMSO	0,989	[163]
Ochrophyta	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Lipide	FCS	x		k.A.	Linear	[164]
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	FAME	DCM	x		Glutaraldehyd	0,860	[162]
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	k.A.	FCS, FACS	x		DMSO	0,990	[165]
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	FAME	FCS	x		Aceton	k.A.	[126]
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Lipide	FCS	x		Waschschritt	k.A.	[163]

1.5.2 Einflussfaktoren auf die Fluoreszenz-Färbeprozess

Eine der wesentlichen Einschränkungen bei der fluorometrischen SL-Quantifizierung ist die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen [166]. Diese basiert einerseits auf dem Aufbau des Geräts, andererseits auf der Komplexität des Färbeprozesses. Abiotische Faktoren wie Konzentration und Inkubationszeit des Farbstoffs sind zu berücksichtigen, während biotische Faktoren, wie Biomasse-Konzentration oder Morphologie, während der Kultivierung variieren und somit ebenfalls Einfluss auf die Reproduzierbarkeit ausüben.

Neben inneren Filtereffekten (IFE, Reduktion der Fluoreszenzintensität durch Absorption und Streuung von Licht durch die Probe), die aus der Biomasse /Zellanzahl resultieren, treten ebenso Quenching und Resonanz-Energie-Transfer-Effekte auf [167]. Resonanz-Energie-Transfer liegt vor, wenn das vom Fluorophor emittierte Licht im Anregungsbereich eines anderen fluorogenen Metaboliten liegt. In diesem Fall würde hauptsächlich oder ausschließlich die Emission des Akzeptors messbar sein. Dieser Effekt kann verstärkt bei Mikroalgen, die intrinsische Fluorophore besitzen, auftreten

Folgend werden verschiedene Einflussgrößen auf den Inkubationsprozess zwischen Farbstoff und SL beschrieben.

Biomasse

Der biotechnologische Kultivierungsprozess kann drei Zustände hervorbringen: Zellkonzentration > Produktkonzentration (Wachstumsphase), Zellkonzentration ~ Produktkonzentration (stationäre Phase), Zellkonzentration < Produktkonzentration (Seneszenz bei Substratüberschuss). Die Biomasse und die Morphologie der Zellen und die Änderungen über die Zeit haben somit einen großen Einfluss auf die Fluoreszenz. Die aus Biomasse-Konzentration resultierenden IFE streuen dabei sowohl Anregungs- als auch Emissionslicht und nehmen mit Zunahme an Biomasse ebenfalls zu [168]. Dadurch ist eine Fluoreszenzabnahme im Zusammenhang mit der Zunahme an Zellen feststellbar. Der anwendbare Zellkonzentrations-Bereich ist speziesspezifisch und variiert zwischen 5×10^4 und 1×10^6 Zellen je mL, wie Ergebnisse mit *Chlorella vulgaris* zeigten [169,170].

Spektrale Eigenschaften der Farbstoffe

Die spektralen Einstellungen, das heißt die Exzitation- und Emissionswellenlängen, sind farbstoffspezifisch. Für NR wird ein weiter Bereich der Anregung beschrieben. Kurze Anregungswellenlängen (450 bis 500 nm) und Emissionswellenlängen um 580 nm begünstigen die Detektion lipophiler Strukturen, während längere Anregungswellenlängen (530 bis 560 nm) und Emissionswellenlängen ≥ 590 nm sich für die Detektion von polaren Lipide eignen [136]. BY zeigt Anregungsbereiche im blauen Bereich (ca. 450 nm) und eine maximale Emission zwischen 490 und 520 nm. Anders als NR werden für BY keine Affinitäten zu anderen cytoplasmatischen Kompartimenten, wie Chloroplasten und Zellmembran beschrieben [171]. Für LipidGreen(1) wurde eine Anregung von 450 nm und eine Emission von 510 nm für die Detektion von PHB verwendet [146].

Carrier Solvents

Carrier-Solvents dienen einerseits den lipophilen Farbstoff in Lösung zu halten und andererseits den Transportprozess zu den Ziel-Strukturen zu gewährleisten. Demnach muss das Carrier-Solvent mit Wasser mischbar sein, da die Zellen im wässrigen Milieu vorliegen. Zur Verbesserung der Färbung wurden eine Vielzahl von Lösungsmitteln wie Aceton, DMSO, Ethanol, Isopropanol, untersucht [133]. Bei den meisten Studien wurden Aceton oder DMSO eingesetzt (**vgl. Tab. 4**).

Aceton ist verglichen zu DMSO wesentlich flüchtiger, welches sich negativ auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auswirken kann. DMSO ist zudem bekannt, schon in geringen Konzentrationen die Zellintegrität zu stören und somit das Eindringen des Farbstoffs und den Färbeprozess zu beschleunigen [172]. So kann mit der Konzentration des Carrier-Solvents ebenfalls Einfluss auf die Permeation und somit auf die Inkubationszeit genommen werden.

Farbstoffkonzentration

Es besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Farbstoffs [169,173]. Um eine angemessene Signal zu erhalten, muss die ausgewählte Farbstoffmenge ausreichend sein, um alle Bestandteile gleichmäßig einzufärben. Andererseits muss die Intensität des Farbstoffs im Detektionsbereich des Geräts liegen. Laut Literatur variieren die verwendeten NR-Konzentrationen für die Färbung von SL in Mikroalgen erheblich (0,01 bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [154,174]. Aufgrund der hohen Quantenausbeute von BY ist die einzusetzende Konzentration im Vergleich zu NR geringer (0,008 – 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [154]. Bei LipidGreen(1) wurden Konzentrationen von 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ für die Bestimmung von PHB verwendet [146].

Inkubationszeit

Um ein stabiles und reproduzierbares Fluoreszenzsignal zu erzielen, bedarf es einer definierten Inkubationszeit. Diese hängt von verschiedenen Einflussgrößen ab und ist somit individuell zu betrachten [175,176]. Nach Zugabe des Farbstoffs steigt die Fluoreszenz an, erreicht ihren Höhepunkt und kann anschließend wieder abnehmen. Die Intensität der Fluoreszenz variiert somit während der Inkubationszeit und ist sowohl abhängig vom Farbstoff- als auch vom Organismus. Dabei wird das Fluoreszenzmaximum bei verschiedenen Arten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht [175,176]. So wurden beispielsweise bei der PHB-Bestimmung mit LipidGreen(1) Inkubationszeiten von 30 min bis 2 h verwendet [146].

1.6 Datenwissenschaftliche Methoden in der Algenbiotechnologie

Datenwissenschaftliche Methoden nehmen in der biotechnologischen Forschung eine immer zentralere Stellung bei der Entschlüsselung komplexer biologischer Systeme und Prozesse ein. Durch diese Techniken ist es möglich, aus umfangreichen Datenmengen bedeutungsvolle Einsichten zu extrahieren [177]. Als ein fachübergreifendes Gebiet befasst sich die Datenwissenschaft mit der Erstellung und Analyse von strukturierten oder unstrukturierten Daten, um Muster und verwertbare Informationen abzuleiten. Dieses wird durch statistische Methoden, Informatik und prädiktive Modell-gestützte Analysen umgesetzt [178]. Die Herangehensweise umfasst die Datenerhebung, Datenprozession, Analyse, Visualisierung und ableitender Interpretation.

In der Biotechnologie beziehen sich datenwissenschaftliche Methoden im traditionellen Sinne auf bioinformatische Aufgaben, wie beispielsweise die Analyse von Genomen. Allerdings ist das Anwendungsspektrum deutlich umfangreicher. So können Daten für die Untersuchung geeigneter Arzneimittel, die Ermittlung neuer Leitstrukturen oder die Auswertung veröffentlichter Informationen durch Metadatenanalysen eingesetzt oder für qualitative oder quantitative Modellerstellung genutzt werden [179,180].

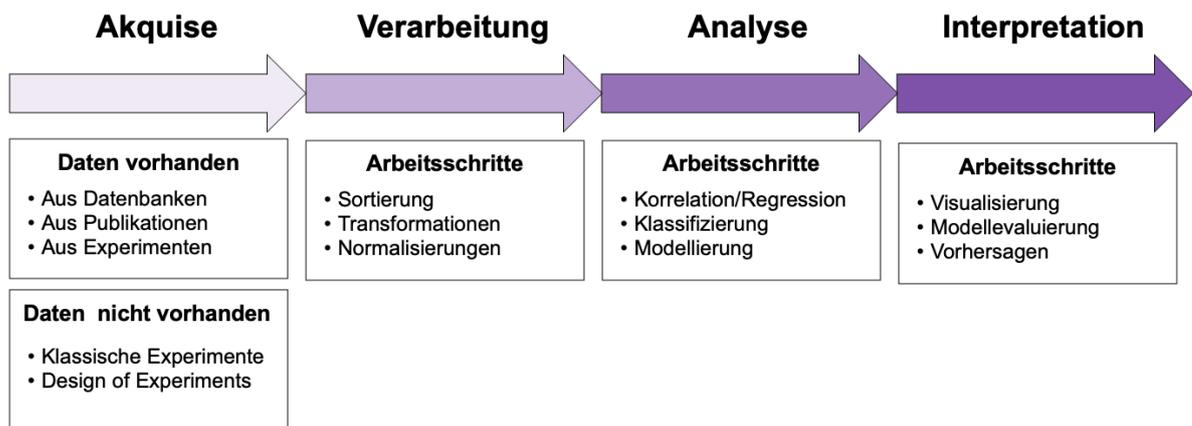


Abb. 8: Herangehensweise datenwissenschaftlicher Arbeiten mit typischen Arbeitsschritten [181].

1.6.1 Systematische Reviews und Metadatenanalyse

Systematische Reviews stellen eine methodisch objektive und reproduzierbare Vorgehensweise dar, mit dem Ziel, umfassende Antworten auf spezifische Forschungsfragen abzuleiten. Dieses wird durch die Erstellung einer systematischen Datenbank, Überprüfung und Analyse der verfügbarer Studien umgesetzt [182].

Anschließend kann durch Nutzung von Studien-übergreifenden Vergleichskriterien eine Metadatenanalyse vorgenommen werden. Die Metadatenanalyse bildet dabei das Fundament für das Verständnis biotechnologischer Forschungsdaten. Hierbei werden durch deskriptive Statistik oder Hypothesentests aggregierte Schätzung generiert. Metadaten liefern somit quantitative Merkmals-Informationen von Daten, während systematische Reviews primär auf die umfassende Sammlung und qualitative Bewertung der Studienergebnisse abzielt [183].

Systematische Reviews und Metaanalysen stammen ursprünglich aus dem medizinischen und klinischen Bereich, um beispielsweise die Effekte von Medikamenten auf Probanden über verschiedene Studien hinweg reproduzierbar vergleichen und interpretieren zu können. In der Mikroalgenbiotechnologie ist diese Art der Herangehensweise im Vergleich zu klassischen Reviews noch neu, weshalb aktuell nur sehr wenige Artikel veröffentlicht wurden. Diese wiederum konzentrieren sich vornehmlich auf den Vergleich der Nutzbarkeit von Mikroalgenlipiden für die Anwendung als Biodiesel [184,185].

1.6.2 Statistische Versuchsplanung

Für die Datenerheben können sowohl traditionelle als auch statistische Ansätze genutzt werden. Letzterer Ansatz, statistische Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE), lässt sich dabei besser mit datenwissenschaftlichen Arbeiten in Einklang bringen. DoE zielt darauf ab, den Ergebnis-Output zu maximieren, wobei die Anzahl der benötigten Experimente reduziert und gleichzeitig die Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Ergebnisse statistisch abgesichert werden. DoE ermöglicht es somit komplexe Systeme effizient zu untersuchen, indem gleichzeitig der Einfluss mehrerer Faktoren und deren Wechselwirkungen auf eine oder mehrere Zielvariablen betrachtet werden. Dieses ist mit klassischer Versuchsdurchführung nicht möglich, in der im Experiment nur ein Faktor variiert werden kann (One-factor-at-a-time method, OFAT) [186].

Die Auswahl eines geeigneten statistischen Designs hängt von der Fragestellung ab. Für Screening-Untersuchungen und die Analyse von Einflussfaktoren eignen sich z.B. Taguchi, Plackett-Burman oder Algorithmen-gestützte Designs wie D-Optimal [187]. Letztere haben gegenüber klassischen Screening-Designs mehrere Vorteile, wie eine höhere quantitative Aussagekraft, erhöhte Effizienz im Zusammenhang mit der Variablenanzahl, Analyse komplexerer Interaktionsmuster und eine bessere Optimierungsfähigkeit. Die Auswertung der Daten erfolgt anschließend über multiple Regression oder Partial-Least-Square (PLS). PLS ist für Screening-Experimente besser geeignet, da hierbei häufig stark korrelierte Zusammenhänge zwischen den Variablen auftreten, die die Genauigkeit von multiplen Regressions-Modellen beeinträchtigen. Andererseits kann multiple Regression nicht eingesetzt werden, wenn die Anzahl der zu untersuchenden Zielgrößen hoch oder die der Variablenanzahl entspricht, da hierbei die Anzahl der Freiheitsgrade stark verringert wird [188].

DoE wurde beispielsweise bei der Analyse und Optimierung von Stoffwechselwegen, zellfreien Proteinsynthesereaktionen und Codon-Use-Algorithmen eingesetzt [189–191]. DoE wurde auch eingesetzt, um die Fermentationsbedingungen bei der PHB-Synthese mit *C. necator* zu optimieren [192,193].

1.6.3 Modell-gestützte Datenanalyse und Prognosen

Die Datenanalyse und Erstellung von Prognosen stehen im Zentrum der datenwissenschaftlichen Methoden. Diese Prozesse beinhalten die Anwendung statistischer Modelle und Modell-gestützte Analysen, um Muster und Beziehungen in Daten zu erkennen und diese für Prognoseerstellung in eine Korrelation zu bringen. Dabei kann in qualitative (Klassifikation) und quantitative (Regression) Modellerstellung unterschieden werden. Gängige Regressions-Modelle sind die der (multiplen) lineare Regression (LR), künstliche neuronale Netzwerke (KNN) oder Support Vector Machines (SVM). LR ist eine statistische Regressionsmethode, die versucht, den Wert einer kontinuierlichen Antwortvariablen auf der Grundlage der Werte mehrerer Prädiktoren vorherzusagen. Das Modell geht davon aus, dass die Antwortvariable eine lineare Kombination der Prädiktoren darstellt. KNN ahmt die Arbeitsweise biologischer Neuronen nach. Die Informationsverarbeitung erfolgt durch die Gewichtung der künstlichen Neuronen.

Jedes Neuron generiert einen Output durch mathematische Formeln. Abhängig von der Informationsbewertung und -gewichtung werden weitere Neuronen miteinander verbunden und mehr oder weniger stark aktiviert [195].

Bei SVM wird der Attributraum der Variablen mithilfe einer Hyperebene unterteilt, um den Abstand zwischen den Instanzen verschiedener Klassen oder Klassenwerten zu maximieren [196]. Aufgrund der einfachen Struktur bietet SVM eine ausgewogene Leistung für Prognosen bei Regressions- und Klassifikationsproblemen und ist auch bei geringem Stichprobenumfang anwendbar. Die Bewertung der Modellqualität kann einerseits durch den Korrelationskoeffizienten (Pearson R) erfolgen oder andererseits durch die Darstellung der vom Modell generierten Werte im Vergleich zu den tatsächlichen Beobachtungen (erhobenen Referenzwerten). Der Anstieg der linearen Regression aus dieser Auftragung entspricht bei idealen Modellen 1,0, sodass durch diese Analyse zwei Kriterien zur Modellbeurteilung resultieren: das Bestimmtheitsmaß (R^2) und der Anstieg.

Für Klassifizierungsfragen bieten sich neben KNN und SVM auch Entscheidungsbäume (TR), logistische Regressionen (LRE) oder das Modell Naive Bayes (NB) an [197]. Für die Klassifizierungsgenauigkeit können verschiedene Kriterien genutzt werden. Zu den wichtigsten gehören die Genauigkeit (Accuracy), die den Anteil der insgesamt korrekt klassifizierten Fälle angibt, die Präzision (Precision), die das Verhältnis aus positiv klassifizierten Fällen zu tatsächlich positiven wiedergibt, die Sensitivität (Sensitivity, Recall), die das Verhältnis der richtig positiven Vorhersagen zur Summe aus richtig positiven und falsch negativen wiedergibt, die Spezifität (Specificity), die angibt, wie gut das Modell tatsächliche negative Fälle als solche erkennt und die Grenzwertoptimierungscharakteristik (Receiver Operating Characteristic, ROC). Die ROC-Kurve stellt die Sensitivität gegenüber der Spezifität für verschiedene Schwellenwerte graphisch dar. Die Fläche unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) gibt einen Gesamtwert dafür an, wie gut das Modell die Klassen unterscheidet. Ein AUC-Wert von 1,0 deutet auf ein perfektes Modell hin, während ein Wert von 0,5 oder geringer kein Unterscheidungsvermögen impliziert.

Die Möglichkeit, modellbasierte Auswertungen und Prognosen von Parametern zu nutzen, nimmt durch die steigende Menge an verfügbaren Informationen und die Pflege von Datenbanken zu. Hierzu leistet auch die Entwicklung von Open-Source-Softwarelösungen, wie beispielsweise Orange3, einen Beitrag. Orange3 stellt ein Werkzeugset für Data-Mining, Datenvisualisierung und maschinelles Lernen bereit und bietet eine visuelle Programmieroberfläche für explorative Datenanalysen sowie interaktive Datenvisualisierung [198]. Die Verwendung der visuellen Elemente (Widgets) gewährleistet zudem eine hohe Transparenz und Nachvollziehbarkeit der Arbeitsschritte.

Die Nutzung von Modell-gestützten Korrelationsanalysen bringt wesentliche Vorteile wie präzise Vorhersagen durch Erkennung komplexer Muster, Anpassungsfähigkeit an neue Daten und Bedingungen, Effizienzsteigerung durch Automatisierung und die Möglichkeit zur Echtzeit-Überwachung [199]. Diese Vorteile führen zu verbesserten Prozessüberwachungen und -steuerungen. Jedoch stehen dem Nachteile wie die Abhängigkeit von der Datenqualität- und menge, die Komplexität der Modellentwicklung, Schwierigkeiten bei der Erklärbarkeit bestimmter Modelle sowie Risiken des Overfittings und Probleme bei der Generalisierung gegenüber [200]. Diese Herausforderungen erfordern eine sorgfältige Modellanwendung und Interpretation, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten.

Anwendungen finden modellgestützte Analysen vor allem bei der Optimierung von Fermentationsprozessen, mit dem Ziel, die Dauer der Fermentation zu verkürzen sowie Ausbeute und Produktqualität zu erhöhen. [201–203]. Bei der phototrophen Kultivierung von Mikroalgen spielen die Parameter der Lichtintensität und der CO₂-Verfügbarkeit eine besondere Rolle. Insbesondere die Modellierung der optimalen Lichtversorgung zur Förderung des Biomassewachstums ist hier von hoher Bedeutung. Weiterhin wurden modellbasierte Methoden genutzt, um die Biomasse- und PHB-Produktion bei *Synechocystis* sp. PCC6803 zu optimieren [204,205]. Trotz den Herausforderungen bieten diese Ansätze vielversprechende Perspektiven für die Entwicklung von maßgeschneiderten Kultivierungsprozessen und Überwachungen.

In dieser Arbeit wurden sowohl Metadatenanalysen, DoE und Modell-gestützte Analysen eingesetzt.

2 Motivation und Hypothesen

Die Motivation dieser Arbeit liegt einerseits im besseren Verständnis und der Optimierung des PHB-Bildungsprozesses in Cyanobakterien und andererseits in der Entwicklung eines zeitnahen Monitorings der Speicherlipid-Konzentrationen (PHB, TAG) in Mikroalgen, um den Bildungsprozess effektiv erfassen und daraus geeignete Erntezeitpunkte ableiten zu können.

Für die Analyse des PHB-Bildungsprozesses wurde das filamentöse Cyanobakterium *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 ausgewählt. Dieses gehört zur Gattung der Synechococcalen Cyanobakterien, genauso wie der Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC6803, und bildet demnach keine spezialisierten Zellen wie Heterocysten (N₂-Fixierung) oder Akineten (Überdauerungsformen) aus, welche die Analyse des PHB-Bildungsprozesses beeinträchtigen könnten. *Leptolyngbya* sp. hat sich in Vorversuchen als sehr robust erwiesen und ist somit ebenso ein geeigneter Kandidat für Skalierungsexperimente. Um die genetische Voraussetzung für die PHB-Biosynthese in dem bisher nicht sequenzierten Organismus zu belegen, wird geplant, den Genabschnitt des Schlüsselenzyms PhaC^{III} zu amplifizieren.

Darüber hinaus sollen geeignete Kultivierungsstrategien unter Stress- und Mangelbedingungen durch Metadatenanalysen identifiziert und im Screening angewandt werden. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Bewertung des Einflusses von Mangelbedingungen und Stressoren auf Biomasse und PHB-Gehalt, um ein umfassenderes Verständnis des Bildungsprozesses zu erlangen. Anschließend sollen die Ergebnisse unter skalierten Laborbedingungen verifiziert werden.

Um den idealen Erntezeitpunkt zu bestimmen, sollen fluoreszenzspektroskopische Messungen für die *in situ*-Quantifizierung von PHB durchgeführt werden. Die Methode wird zunächst am PHB-bildenden heterotrophen Organismus *Cupriavidus necator* entwickelt und dann auf PHB- und TAG-produzierende Mikroalgen übertragen. *C. necator*, bekannt für die Bildung hoher PHB-Konzentrationen unter variablen Bedingungen, dient dabei als Modell, um die Methode über einen breiteren Konzentrationsbereich abzusichern. Die PHB-Bildung in Cyanobakterien ist komplexer und resultiert zudem in geringen Produktausbeuten, wodurch sich die direkte Entwicklung der Methode mit *Leptolyngbya* sp. nicht eignet.

Sowohl *Leptolyngbya* sp. als auch *C. necator* bilden Zellketten aus und sind durch eine ähnliche Morphologie (gram-negative Bakterien) gekennzeichnet. Durch die hohe Ähnlichkeit soll eine erfolgreiche Übertragung der entwickelten Fluoreszenzmethode gewährleistet werden.

Als Fluoreszenzfarbstoff wird LipidGreen2 im Vergleich zu Nile red und BODIPY^{493/503} untersucht und die Färbebedingungen optimiert. Ziel ist es, durch Korrelationsanalysen und modellgestützte Analysen eine präzise Vorhersagegenauigkeit zu erreichen.

Anschließend soll die Übertragbarkeit der an *C. necator* entwickelten Methode auf die Bestimmung von PHB in *Leptolyngbya* sp. und TAG in eukaryotischen Mikroalgen geprüft werden. Für das TAG-Monitoring wurden *Stichococcus* sp. WB2 (Chlorophyta), *Nannochloropsis salina* (Heterokontophyta) und *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) ausgewählt, um die gattungsübergreifende Anwendbarkeit zu bestätigen. Die ausgewählten Organismen sind dafür bekannt TAGs in unterschiedlicher Ausprägung zu bilden. Zuletzt soll untersucht werden, ob auf Basis der erhobenen Fluoreszenzdaten eine Differenzierung der Speicherlipid-Typen möglich ist, was die Spezifität der Methodik bestätigen und die Möglichkeit zur Differenzierung der SL-Typen durch Fluoreszenzspektroskopie eröffnen würde.

Auf Grundlage der Zielstellungen werden folgende Hypothesen und Fragestellungen in dieser Arbeit geprüft:

H1: Das Fluoreszenzverhalten zwischen LG2 und PHB in *C. necator* basiert auf den molekularen Eigenschaften des Farbstoffs sowie biotischen und abiotischen Parametern.

- Eignet sich LG2 auf Basis der physiko-chemischen Eigenschaften für die Bestimmung von PHB in *C. necator*?
- Welche Parameter haben den größten Einfluss auf die Fluoreszenz und Inkubationszeit?
- Welchen Einfluss hat das Streulicht auf die Reproduzierbarkeit der Methode?
- Welche Modelle eignen sich zur Wiedergabe der analytischen Messdaten?

H2: Mixotrophe Mangel-Kultivierung katalysiert die PHB-Bildung im Cyanobakterium *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

- Welche biotischen und abiotischen Parameter haben den größten Effekt auf die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp.?
- Welche Rolle spielt die Glykogenbildung im Zusammenhang mit der PHB-Bildung?
- Ist *Leptolyngbya* sp. zur Bildung weiterer SL (TAGs) befähigt?
- Welche skalierbare Kultivierungsstrategie eignet sich für die PHB-Produktion

H3: Phylogenetische Distanzen und zellmorphologische Unterschiede beeinträchtigen die Speicherlipid-Bestimmung mit der LG2-Fluoreszenz in Mikroalgen.

- Kann die an *C. necator* entwickelte Fluoreszenzmethode auf PHB- und Lipid/TAG-produzierende Mikroalgen übertragen werden?
- Beeinflussen die SL-Art, Zusammensetzung und Zellmorphologie die Übertragbarkeit?
- Ergibt sich eine universelle Herangehensweise zur Messung der Zielgrößen durch Fluoreszenz?

H4: Die Speicherlipidart und -zusammensetzung variiert in Mikroalgen und kann mittels LG2 *in situ* differenziert werden.

- Ändert sich die Emissionswellenlänge von LG2 in Abhängigkeit des SL-Typs?
- Welchen Einfluss haben unterschiedliche SL-Konzentrationsausprägungen und Zusammensetzung auf die Fluoreszenz?
- Kann aufgrund der Fluoreszenzdaten eine Klassifizierung vorgenommen werden?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren analytischer Qualität, und wurden, falls im Text nicht anders angegeben, entweder von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich / Merck (Darmstadt, Deutschland) oder VWR bezogen (Delaware Valley, USA).

3.2 Experimenteller Aufbau und Probenverarbeitung

Eine Übersicht der allgemeinen Probenverarbeitung ist in **Abb. 9** dargestellt.

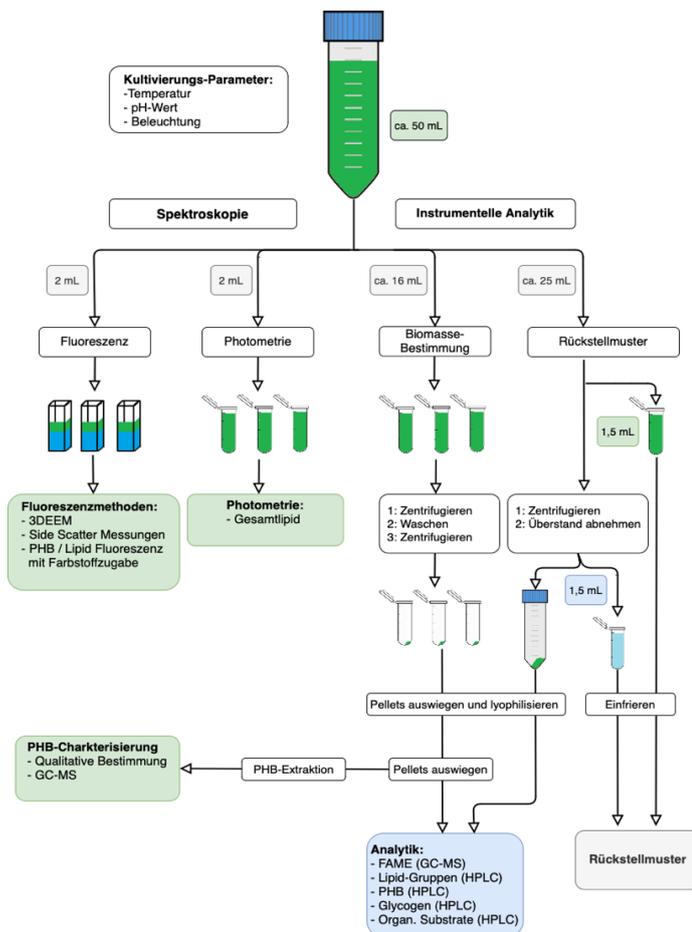


Abb. 9: Allgemeine Übersicht der Probenverarbeitung. Abkürzungen: 3DEEM: dreidimensionale Exzitations-Emissions-Matrix, FAME: Fettsäuremethylester, GC-MS: Gaschromatographie mit Massenspektrometer, HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, PHB: Polyhydroxybutyrat.

3.3 Organismen und Kultivierungsbedingungen

Der Organismus *Cupriavidus necator* (**Kapitel 3.3.1**) wurde zur Beantwortung der Hypothese **H1** und **H4**, *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 3.3.2**) zur Beantwortung von **H2**, **H3** und **H4** und die eukaryotischen Mikroalgen (**Kapitel 3.3.3**) zur Beurteilung der Hypothese **H3** und **H4** eingesetzt.

3.3.1 *Cupriavidus necator*

Die Synthese von PHB wurde mit *C. necator* DSM 545, der von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben wurde, durchgeführt. Die Fermentation erfolgte in drei aufeinander aufbauenden Schritten mit jeweils definierter Medienzusammensetzung (**Tab. 5**) [206]. Zunächst wurden die Bakterien in einer nährstoffreichen Bouillon für 48 h bei 180 rpm bei 30 °C angezogen (Start-Kultur). In einem zweiten Schritt wurde die Kultur in einem Anzuchtsmedium mit 10 % Inokulum aus der Start-Kultur überführt und für 48 h fermentiert.

Tab. 5: Medienzusammensetzung für die Polyhydroxybutyrat-Synthese mit *Cupriavidus necator* nach [206]. Spurenelementlösung: 10 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O, 2,25 g L⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 1,0 g L⁻¹ CuSO₄ 5H₂O, 0,5 g L⁻¹ MnSO₄ 5H₂O, 2,0 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O, 0,23 g L⁻¹ Na₂B₄O₇ 7H₂O, 0,1 g L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ und 10 ml L⁻¹ 35 % HCl [207].

Medien-Bestandteil	Start-Kultur	Anzucht	N-Mangel	Pi-Mangel	NaCl-Stress
Pepton	5,0 g L ⁻¹				
Fleischextrakt	3,0 g L ⁻¹				
Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O)		9,0 g L ⁻¹	9,0 g L ⁻¹	-	9,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄		1,5 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹	0,5 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄		1,0 g L ⁻¹	0,5 g L ⁻¹	4,0 g L ⁻¹	4,0 g L ⁻¹
MgSO ₄ (7H ₂ O)		0,2 g L ⁻¹	1,2 g L ⁻¹	1,2 g L ⁻¹	1,2 g L ⁻¹
Zitronensäure		-	1,7 g L ⁻¹	1,7 g L ⁻¹	1,7 g L ⁻¹
NaCl		-	-	-	2,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung		1 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Glucose / Fructose		5 / 5 g L ⁻¹	10 / 10 g L ⁻¹	10 / 10 g L ⁻¹	10 / 10 g L ⁻¹

Anschließend wurde die Bildung von PHB durch N-Mangel bei 30 °C und 250 rpm in 2,0 L belüfteten Bioreaktor induziert und für 72 – 96 h fermentiert. P_i-Mangel und osmotischer Stress (NaCl) wurden als alternative Methoden der PHB-Bildung im Zusammenhang mit der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen der Fluoreszenzmethode (**Kapitel 4.2.3**) eingesetzt. Der pH-Wert aller Kulturen wurde initial auf 7,2±0,2 mit NaOH eingestellt. Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen unter sterilen Bedingungen entnommen und anschließende Messungen als Triplikat durchgeführt.

3.3.2 *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

Leptolyngbya sp. NIVA-CYA 255 wurde von der norwegischen Algenstammsammlung (NORCCA) bezogen [208]. Die PHB-Synthese erfolgte in drei aufeinander aufbauenden Stufen in 2,5 L Blasensäulen. Zuerst wurde Biomasse in BG₁₁-Wachstumsmedium für 14 d herangezogen (Stufe 1). Basierend auf Rippka *et al.* bestehend aus 1,5 g L⁻¹ NaNO₃, 0,04 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0,075 g L⁻¹ MgSO₄ x 7H₂O, 0,036 g L⁻¹ CaCl₂ x 2H₂O, 0,006 g L⁻¹ Zitronensäure, 0,006 g L⁻¹ Eisen- Ammoniumcitrat, 0,001 g L⁻¹ Na₂EDTA 2H₂O, 0,02 g L⁻¹ Na₂CO₃; Spurenelementlösung: 2,86 g L⁻¹ H₃BO₃, 1,81 g L⁻¹ MnCl₂ 4H₂O, 0,222 g L⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 0,39 g L⁻¹ Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,079 g L⁻¹ CuSO₄ 5H₂O, 0,0494 g L⁻¹ Co(NO₃)₂ 6H₂O [209]. In der zweiten Stufe (Mangel-Bedingung) wurden 25 % als Inokulum aus der ersten Stufe mit der dreifachen Menge an Mangelmedien aufgefüllt und über 16 d kultiviert. Dazu wurden folgende Mangelarten verwendet: N-Mangel, P_i-Mangel, NP_i-Mangel oder ausbalanciertes BG₁₁. Die Durchführung der Stufe eins und zwei erfolgte im Zusammenhang mit einer studentischen Projektarbeit (Titel: Untersuchung unterschiedlicher Stressoren auf das Wachstum & die Poly-3-hydroxybutyrat Akkumulation in *Leptolyngbya* sp. unter photoautotrophen Bedingungen, Autoren: Philipp David Sengupta und Anna Katharina Kottwitz). In der dritten Stufe wurde 2,0 g L⁻¹-Natriumacetat zugegeben (mixotrophe Mangel-Bedingung). Die Kultivierung der dritten Stufe erfolgte über 8 d. Der pH-Wert jedes Mediums wurde zu Beginn der ersten Stufe auf 8,0 eingestellt. Die gesamte Kultivierung erfolgte bei 26 °C, einer Bestrahlung von 100 mol s⁻¹ m⁻², 12 h Hell-/Dunkelzyklus und 5 % (v/v) CO₂ Beimischung zur Druckluft (1 vvm). Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen unter sterilen Bedingungen entnommen und anschließende Messungen als Triplikat durchgeführt.

Die Untersuchung und Optimierung der Einflussfaktoren auf die PHB-Synthese basierte auf DoE (**Kapitel 3.10.3**) und wurde in 12-Well-Zellkultur-Platten (Cellstar, Greiner Bio-one, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) mit einem Volumen von 4,5 mL umgesetzt. Für die Untersuchung wurde eine über 21 d auf N-Mangel (gelbe) phototroph gestresste und eine nicht gestresste (grüne) Kultur eingesetzt. Zur Schaffung gleicher Ausgangsbedingungen wurden die Biomassekonzentration über OD₇₅₀-Messungen auf 1,0 justiert. Jeweils eine Well-Platte je Kulturstatus wurde unter Lichtausschluss stehend, und eine unter belichteten und geschüttelten Bedingungen (90 rpm, GFL, Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) kultiviert. Die Versuchsdauer betrug 8 d bei 24 °C. In Abhängigkeit des Wells variierte gemäß des statistischen Versuchsplans die Medienzusammensetzung des BG₁₁-Mediums, sowie die Art und Konzentration der zugesetzten Stressoren und organischen C-Quellen (**Tab. 6**).

Tab. 6: Eingesetzte Faktoreneinstellungen im statistischen Versuchsplan. Medienzusammensetzung basierte auf dem BG₁₁-Medium [209]. Nicht aufgeführte Medienbestandteile verblieben unverändert. Plan: D-Optimal, erstellt mit Visual Xsel. GE: Belichtung und Gasaustausch, GEL: Gasaustauschlimitation, dunkel; TES: Spurenelementlösung.

Faktoren		Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
Kulturstatus		grün (nicht gestresst)	gelb (vorgestresst)	-	-
Kultivierungstyp		GS	GEL		
Mediumbestandteil	NaNO ₃ [g L ⁻¹]	0	0,38	0,75	1,5
	K ₂ HPO ₄ [g L ⁻¹]	0	0,01	0,02	0,04
	Na ₂ CO ₃ [g L ⁻¹]	0	0,005	0,01	0,02
	TES [mL L ⁻¹]	0	1	2	4
Osmotischer Stress	NaCl [g L ⁻¹]	0	10	20	40
Oxidativer Stress	EtOH [%]	0	1	2	4
	H ₂ O ₂ [mM]	0	1	4	8
C-Quelle	Acetat [g L ⁻¹]	0	1	5	10
	Fructose [g L ⁻¹]	0	1	5	10
	Glucose [g L ⁻¹]	0	1	5	10

3.3.3 Eukaryotische Mikroalgen

Die eukaryotischen Mikroalgen *Nannochloropsis salina* (SAG 40.85) und *Porphyridium purpureum* (SAG 1380-1a) wurden von der Algenstammsammlung der Universität Göttingen (SAG) bezogen. *Stichococcus* sp. WB2 ist ein terrestrisches Eigenisolat der Hochschule Anhalt, AG Algenbiotechnologie. Alle Kulturen wurden entsprechend empfohlener Medien über einen Zeitraum von 14 d unter ausbalancierten Wachstumsbedingungen (Stufe 1) angezogen (Tab. 7). Zur Induktion erhöhter Lipidbildung wurde N-Mangel genutzt (Stufe 2). Dazu wurden 500 mL der Kultur aus Stufe 1 mit 1000 mL N-freies Medium vereint und die Kultivierung für weitere 14 d fortgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in Plastik-Einweg-Taschen bei 24 °C, einer Bestrahlung von 100 mol s⁻¹ m⁻², 12 h Hell-/ Dunkelzyklus und 5 % (v/v) CO₂ Beimischung zur Druckluft (1 vvm). Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen unter sterilen Bedingungen entnommen und anschließende Messungen als Triplikat durchgeführt.

Tab. 7: Medienzusammensetzung bei der Kultivierung eukaryotischer Mikroalgen. ASW: Artifizielles Seewasser, BBM: Bold's Basal-Medium, SWES: Boden und Seewasser-Medium. [210]

	Substanz	BBM	1/2 SWES	ASW
Organismus		<i>Stichococcus</i> <i>sp. WB02</i>	<i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i>	<i>Porphyridium</i> <i>purpureum</i>
Makroelemente [g L ⁻¹]	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,025		1,5
	CaSO ₄		0,61	
	Fe-EDTA			0,05
	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,075		
	KH ₂ PO ₄	0,175	0,02	0,07
	KNO ₃		0,2	1,0
	MgCl ₂ 6H ₂ O		0,19	5,6
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,075	0,02	6,6
	NaCl	0,025		27
	Na-EDTA	0,072	40	
	NaHCO ₃			0,04
	NaNO ₃	0,25		
	NH ₄ NO ₃			0,2

	Substanz	BBM	1/2 SWES	ASW
Organismus		<i>Stichococcus sp. WB02</i>	<i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>
Spurenelemente [mg L ⁻¹]	ZnCl ₂			0,04
	ZnSO ₄	0,09	0,005	
	H ₃ BO ₃	0,18	0,01	0,6
	CuSO ₄ 5H ₂ O	4,5 10 ⁻⁴	2,5 10 ⁻⁵	
	CoCl ₂			0,015
	Co(NO ₃) ₂ 6 H ₂ O	0,018	0,001	
	CuCl ₂			0,04
	FeCl ₃ 6H ₂ O			0,002
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,63	0,035	
	MnCl ₂			0,4
	MnSO ₄	0,09	0,005	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O			0,37
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,018	0,001	

3.4 Molekularbiologische Methoden und verwendete Isolate

Für die Detektion des PhaC^{III}-Synthase-Genes in *Leptolyngbya* sp NIVA-CYA 255 und in anderen Mikroorganismen (**Kapitel 4.3.1**) wurden publizierte Primer verwendet (**Tab. 8**) [106]. Die Primer wurden hinsichtlich der Sekundärstrukturen, Länge, Schmelzpunkt und GC-Gehalt mit dem OligoAnalyzer Tool (IDT, Coralville, USA) untersucht. Die DNA-Isolation erfolgte von den jeweils axenisch-angezogenen Mikroalgen mit dem Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland). Touchdown Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (AriaMx QPCR, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurde verwendet, um das PhaC^{III}-Gen in den Isolaten zu amplifizieren.

Tab. 8: Verwendete Primer für die Detektion des PhaC^{III}-Genabschnittes durch Polymerasekettenreaktion. Eigenschaften wurden mit OligoAnalyzer Tool berechnet. Forward-Primer sind mit _F und Reverse Primer mit _R gekennzeichnet. [106].

Primer	Sequenz	GC [%]	T _m [°C]
PhaC_F	5'- GGGA TGTC TATT TGAT TGAY TGG -3'	43.2	59.8
PhaC_R	5'- TGGA TTTT TGAT AGTC CCGA CC -3'	40.9	63.3

Als Amplifikations-Kit wurde Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, USA), nach Herstellerprotokoll angewandt. Die Template-DNA-Konzentration wurde auf $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ eingestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind die PCR-Bedingungen aufgeführt.

Tab. 9: Touchdown-Protokoll der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des PhaC^{III}-Genabschnitts.

Phase	Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	98	30	1
2	Denaturierung	98	10	10 Zyklen T _a reduziert bei jedem Zyklus um 1°C
	Annealing (T _a)	70 - 60	30	
	Extension	72	45	
3	Denaturierung	98	10	20
	Annealing	60	30	
	Extension	72	45	
4	Finale Extension	72	600	1
5	Stopp	4	-	1

Native Agarose-Gel-Elektrophorese wurde verwendet, um die Größe von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen zu bestimmen. Das 1 %ige Agarosegel wurde mit TAE-Puffer (89 mM Tris pH 7,6, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) in der Mikrowelle durch Erhitzen hergestellt. Nach dem Abkühlen wurde 5 μL SYBR Safe DNA-Gel Stain (Thermo Scientific, Waltham, USA) je 100 mL warmen Gels zugegeben. Nach Aushärten wurden 10 μL des PCR-Reaktion-Mix in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese (Biometra, Analytik-Jana, Jena, Deutschland) wurde bei 100 mV / ca. 140 mA für 40 min durchgeführt. Zur Gelgrößenabschätzung wurden Low-Range Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet. PCR-Kontrolle und Bandenabgleich fanden visuell bei einer Beleuchtung von 254 nm (Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) statt.

In der folgenden Tabelle sind alle weiteren verwendeten Organismen aufgeführt, deren genomische DNA isoliert und in der PCR zum Nachweis von PhaC^{III} eingesetzt wurde.

Tab. 10: Verwendete Organismen für die Isolation genomischer DNA. DSMZ: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, KASC: Köthener Algenstammsammlung, PCC: Pasteur Culture Collection Paris, SAG: Stammsammlung der Algen, Universität Göttingen.

Phylum	Isolat	Herkunft
Chlorophyta	<i>Chlorella vulgaris</i>	SAG 211-11b, KASC04-08
	Chlorophyta Isolat BA1	Eigenisolat
	Chlorophyta Isolat BA2A	Eigenisolat
	Chlorophyta Isolat BA2B	Eigenisolat
Cyanophyta	<i>Arthrospira platensis</i>	Eigenisolat
	<i>Halomikronema</i> sp. C5	Eigenisolat
	Nostocales Isolat MAL2-1	Eigenisolat
	Nostocales Isolat Rogätz II/2	Eigenisolat
	Nostocales Isolat I001	Eigenisolat KASC_I001
	<i>Nostoc muscorum</i>	SAG 1453-12b, KASC21-02
	Oscillatoriales Cyanobakterium C1	Eigenisolat
	Oscillatoriales Cyanobakt. PS2-KN9	Eigenisolat
	Synechococcales Cyanobakt. C2	Eigenisolat
	Synechococcales Cyanobakt. C10	Eigenisolat
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	PCC, KASC53-01	
Rhodophyta	<i>Galdieria sulphuraria</i>	SAG 108.79, KASC47-011
Gamma-Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> DH5a	HS Anhalt, AG Mägert
	<i>Pseudomonas putida</i> DSM6125	DSMZ

3.5 Biomassebestimmung und Produktaufarbeitung

Biomassebestimmung (**Kapitel 3.5.1**) wurde für Korrelationsstudien mit *C. necator* sowie zur Beantwortung der Hypothesen **H2** und **H3** eingesetzt. Untersuchung der Biomassezusammensetzung, PHB-Extraktion (**Kapitel 3.5.3**) und Polymeranalytik (**Kapitel 3.5.4**) erfolgte im Zusammenhang mit **H2**.

3.5.1 Biomassebestimmung und Optische Dichte

Biomassebestimmung erfolgte gravimetrisch. Dazu wurden in Abhängigkeit der ungefähr zu erwartenden Konzentration 4 bis 12 mL Zellkultur in vorausgewogenen Mikroreaktionsgefäßen (VWR, Darmstadt, Deutschland) bei 10.000 g für 5 min zentrifugiert (Thermo Scientific, Waltham, USA), anschließend gewaschen, schock-gefrostet und durch Lyophilisation (Christ Martin, Osterode, Deutschland) getrocknet. Die Biomassekonzentration wurde aus dem Verhältnis der ermittelten Biomasse zum verwendeten Zellkulturvolumen berechnet.

Die optische Dichte der Zellkulturen wurden bei 750 nm (OD_{750}) photometrisch ermittelt (DR 6000, Hach-Lange, Berlin, Deutschland) und zum Einstellen der Zellkulturkonzentration auf gleiche Ausgangsbedingungen eingesetzt (**siehe Kapitel 3.3.2**).

3.5.2 Elementare Zusammensetzung der Biomasse

Die elementare Zusammensetzung der Biomasse wurde durch CHNS-Verteilung mit einem Vario MICRO Cube (elementary, Langenselbold, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden bis zu 5 mg Trockenbiomasse auf Zinn-Schiffchen eingewogen. Die simultane Quantifizierung der prozentualen Zusammensetzung an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff erfolgte dabei über die Verbrennungsprodukte CO_2 , H_2O , NO_2 . Der Proteingehalt wurde aus dem N-Anteil unter Anwendung des Faktors 4.44 abgeleitet [211].

3.5.3 Polyhydroxybutyrat-Extraktion

PHB wurde aus getrockneter 10 - 20 mg Biomasse mit 10 mL Chloroform in versiegelten Glasextraktionsröhrchen für 60 min bei 70 °C extrahiert. Die Extrakte wurden durch Heißfiltration von der Restbiomasse getrennt, mit 5 mL kaltem Ethanol ausgefällt, filtriert, mit 20 mL Aceton und 40 mL Wasser gewaschen und bei 60 °C über Nacht getrocknet. Der PHB-Anteil ergab sich dabei aus dem Verhältnis der Masse getrocknetem PHBs zur eingewogenen Biomasse.

3.5.4 Polymeranalytik

Das aus den Mikroorganismen extrahierte PHA wurde auf Konformität mit Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) unter Verwendung eines Bruker Tensor 27 (Bruker Corp., Billerica, USA) analysiert, der mit einer abgeschwächten Totalreflexionseinheit (ATR) ausgestattet war. Interferogramme wurden zwischen 550 und 4.000 cm^{-1} aufgezeichnet. Die Proben wurden 30-mal mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gescannt. Das resultierende Schwingungsmuster der funktionellen Gruppen wurde mit Literaturdaten und PHB-Standard verglichen.

3.6 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden im Zusammenhang mit der Untersuchung molekularer Eigenschaften von LG2 und Einfluss abiotischer und Faktoren auf den Färbeprozess (**H1**), Anwendung LG2 zur Bestimmung von SL in Mikroalgen (**H3**) und Differenzierung der SL-Art durch LG2-Fluoreszenz (**H4**) durchgeführt. Zur Beantwortung von **H1** wurden zudem die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe mittels 3D-Exzitations-Emissionsmatrix (3DEEM) (**Kapitel 3.6.2**) bestimmt. Die Beantwortung aller weiteren Fragestellungen erfolgten mit definierten Exzitationswellenlängen wie in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.6.1 Geräteaufbau und methodisches Set-Up

Fluoreszenzmessungen wurden mit einem LS45 (Perkin Elmer, Waltham, USA) mit 1 cm Standardküvetten (Brand, Wertheim, Deutschland) durchgeführt. Für alle Experimente wurden die Exzitations- und Emissionsschlitze auf 10 nm und die Verstärkung auf 650 V (*C. necator*) bzw. 700 V (Mikroalgen) eingestellt. Die Scangeschwindigkeit wurde gleichbleibend und unabhängig der Messmethodik auf 1000 nm min⁻¹ gesetzt. Die Emission wurde über einen Bereich von 200 nm, beginnend 20 nm nach der jeweiligen Exzitation aufgezeichnet. Eine Validierung mit dem geräteigenen Validierungsprogramm erfolgte an jedem Beprobungstag. Exzitations- und Emissionswellenlängen wurden in **Kapitel 4.1.1** untersucht und anschließend für Folgeexperimente verwendet (**siehe Abb. 11, Abb. A 8**). Die Extraktion einzelner Emissionspunkte, wie die Intensität des Emissionsmaximum, erfolgte manuell durch das Programm BL Studio (BioLight, Uhldingen-Mühlhofen, Deutschland). Für eine Berücksichtigung der aus der Zellkulturkonzentration ableitenden IFE wurde ein definiertes Kulturvolumen, gemischt mit Puffer, eingesetzt (**Abb. 10**). Zuerst wurde dabei das Seitwärtsstreulicht (SSC) unter den spektralen Einstellungen der eigentlichen Fluoreszenzmessungen aufgezeichnet. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, die Probe mit dem Farbstoff inkubiert und die Fluoreszenz (RF) der Probe aufgenommen. Dieses Verfahren wurde bei allen Korrelationsstudien eingesetzt. SSC wurde nicht bei der Untersuchung der spektralen Bereiche, Charakterisierung von LG2 und Analyse und Optimierung der Färbebedingungen (**Kapitel 3.6.1 – 3.6.3**) gemessen.

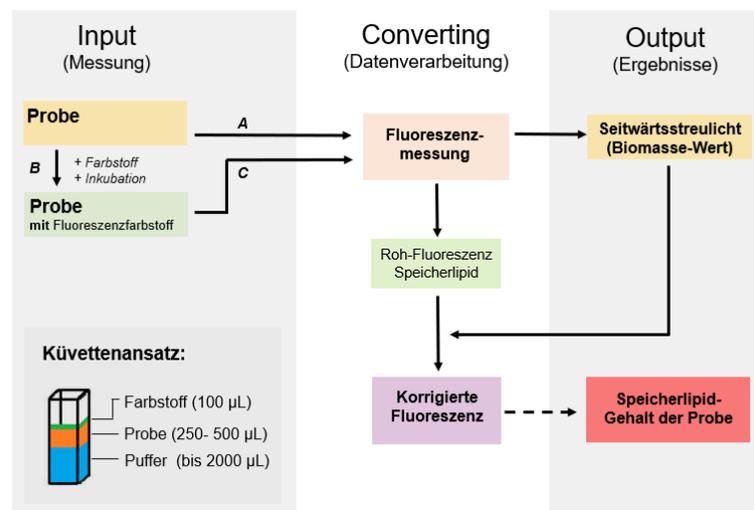


Abb. 10: Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Messdurchführung am Perkin Elmer LS45.

3.6.2 Untersuchung spektraler Bereiche

Solvatochromie sowie optimale Anregungs- und Emissionsbereiche der Fluoreszenz-Farbstoffe wurden mit 3D-Exzitations-Emissionsmatrix (3DEEM) untersucht. Dafür wurden Konzentrationen von $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (NR, LG2) und $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BY), 5% DMSO und 30 min Inkubation unter Lichtausschluss angewendet und der Spektralbereich zwischen 300 - 800 nm in 10 nm-Schritten gescannt. Messungen wurden in salinen Phosphatpuffer (PBS, $2,34 \text{ mg L}^{-1}$ NaCl, $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ KCl, $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ Na_2HPO_4 und $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ KH_2PO_4) als polare Umgebung und mit PHB-angereicherten *C. necator* Zellen (lipophile Umgebung) durchgeführt. Aus den Scans wurden Exzitation und Emission definiert, die für nachfolgende Experimente genutzt wurden.

3.6.3 Charakterisierung von LipidGreen2

Die Charakterisierung der Langzeitstabilität, der Stabilität gegenüber der Belichtung während der Inkubation und die Quantenausbeute von LG2 fanden im Vergleich zu NR statt. Zur Ermittlung der Quantenausbeute, die das Maß aus absorbierten Photonen zu emittierten wiedergibt, wurde die Absorption des jeweiligen Farbstoffes auf 0,005 bis 0,1 am Photometer (DR 6000, Hach-Lange, Berlin, Deutschland) eingestellt. Durch Absorptionsscans wurde das Absorptionsmaxima bestimmt. Für die anschließenden Fluoreszenzmessungen wurden jene Verdünnungen weiterverwendet, deren Absorption sich im linearen Zusammenhang zur eingesetzten Farbstoffkonzentration befanden. Die Absorptionsmaxima dienten als Anregungswellenlängen der Fluoreszenzmessung. Der Anstieg der Geradengleichung aus Absorption und Fluoreszenzemission ist dabei direkt proportional zur Quantenausbeute. Zur besseren Vergleichbarkeit fanden die Messungen in reinem DMSO statt.

Die Untersuchung der Langzeitstabilität erfolgte über 10 h bei diskontinuierlicher Messung (6 min^{-1}). Ebenso wurde der Einfluss des Umgebungslichtes auf die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationszeit untersucht. Dafür wurden Lichtintensitäten von $0 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Lichtausschluss), $10 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Raumlicht), $100 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Starklicht) sowie Inkubationszeiten von 0 – 120 min berücksichtigt. PBS-Puffer und PHB-angereicherten *C. necator* Zellen dienten als polare bzw. lipophile Umgebung.

3.6.4 Analyse und Optimierung der Färbebedingungen

Um die Färbungsbedingungen und die Auswirkungen von abiotischen und biotischen Parametern auf den Färbeprozess zu untersuchen, wurde DoE für die Farbstoffe BY, LG2 und NR genutzt. Die *C. necator* Zellkultursuspension wurde mit PBS-Puffer, Fluoreszenzfarbstoff, DMSO und Isopropanol direkt in den Küvetten gemischt, um die jeweilige Zusammensetzung des Versuchsplans zu erzielen (**Tab. 11**). Die Farbstoffe wurden in DMSO verdünnt, um eine $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BY) bzw. $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LG2, NR) Stammlösung zu erhalten. Getestet wurden die Puffer-Systeme PBS (I) und PBS II, bestehend aus PBS I, $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ EDTA und $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ Tris, beide eingestellt auf pH 7,5. Die Inkubation wurde unter Raumlicht bei Raumtemperatur für 1, 2, 5 und 10 min durchgeführt.

Tab. 11: Eingesetzte Parameter im statistischen Versuchsplan. Plan: D-Optimal, erstellt mit Visual Xsel. PBS I: 137 mM NaCl , $2,7 \text{ mM KCl}$, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ und $1,8 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ und PBS II: PBS I, 10 mM EDTA und 10 mM Tris , pH 7,5. 1: Konzentration von BODIPY^{493/503} wurden auf Grund hoher Emission um den Faktor 10 reduziert eingesetzt.

Parameter		Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
DMSO	[%]	0	5	10	
Puffer	[-]	PBS I	PBS II		
Biomasse	[mL]	0,25	0,5	1	
Farbstoffkonzentration ¹	[$\mu\text{g mL}^{-1}$]	0,5	1,0	2,0	
Isopropanol	[%]	0	5	10	
Inkubationszeit	[min]	1	2	5	10

3.6.5 Datenprozession

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen SSC und der RF, basierte die Durchführung auf zwei aufeinander folgende Messungen (**Kapitel 3.6.1**). Der Informationsgehalt aus beiden Messungen wurde anschließend für die Korrelationsanalysen zwischen Fluoreszenz-Signal zum Speicherlipidgehalt berücksichtigt.

3.6.6 Chlorophyll- und Phycocyanin-Fluoreszenz

Die Aufnahme der Emission von Chlorophyll und Phycocyanin erfolgte im gleichen Küvetten-Setup wie zuvor beschrieben. Dabei kam sowohl 3DEEM als auch Punktmessungen zum Einsatz. Phycocyanin wurde bei der Wellenlänge von 570 nm angeregt und die Emission bei 655 nm erfasst. Die Anregung von Chlorophyll erfolgte bei 440 nm und die Emissionsdetektion bei 685 nm.

3.7 Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Bestimmungen dienten zur visuellen Darstellung der Mikroorganismen und zum Nachweis der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs in den PHA-Granula bzw. den TAG-angereicherten Lipidkörpern. Mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus BX41-Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan). Um intrazellulär-akkumulierte PHB-Granula und Lipidkörper sichtbar zu machen, wurden Anregungsfilter von 400 – 440 nm, für BY und 460 – 490 nm für LG2 und NR genutzt. Der Färbeprozess erfolgte unter gleichen Bedingungen, wie die der fluoreszenzspektroskopischen Messungen (**siehe Kapitel 3.6.1**), jedoch mit einer verlängerten Inkubationszeit (30 min). Anschließend wurden 10 - 20 µL der Zellkultur auf einen Objektträger überführt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und für ca. 10 min, bis zur Absetzung der Kultur, stehen gelassen. Anschließend wurden Bilder mit einer Olympus XC50 Kamera und der cellSens Standardsoftware (Olympus) bei Vergrößerungen von 10x und 40x aufgenommen.

3.8 Chromatographische Methoden

Messungen der PHB- und Glykogen-Konzentration mittels HPLC (**Kapitel 3.8.1**) erfolgte für Korrelationsstudien zu den Fluoreszenzdaten (**H1, H3**) und der Analyse abiotischer und biotischer Einflussfaktoren auf den PHB-Bildungsprozess in *Leptolyngbya* sp. (**H2**). GC-MS (**Kapitel 3.8.2**) und FAME-Analysen (**Kapitel 3.8.4**) wurden zum Nachweis der PHA- bzw. SL-Zusammensetzung in *Leptolyngbya* sp. (**H2**) verwendet. Lipidgruppen-Analyse (**Kapitel 3.8.3**) diente zur Bestimmung des TAG-Anteils am Gesamtlipidgehalt und erfolgte zur Beantwortung der Hypothesen **H2** und **H3**.

3.8.1 Quantifizierung von Polyhydroxybutyrat und Glykogen

PHB und Glykogen wurden durch HPLC bestimmt. Die Methoden basierten auf zuvor publizierten Verfahren [109,212,213]. Für die PHB und Glykogenbestimmung wurden 1 – 10 mg Biotrockenmasse mit 75 % H₂SO₄ (PHB-Bestimmung) bzw. 7,5 % H₂SO₄ (Glykogen-Bestimmung) versetzt, bei 95 °C für 60 min inkubiert und vor der Messung mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Standardreihen wurden durch Einwaage der entsprechenden Analyten erstellt und zur Kalibrierung und Berechnung der Konzentrationen verwendet. Die isokratische Trennung erfolgte mit einer Merck-Hitachi HPLC. Als stationäre Phase wurde eine SugarSep-H-Säule (250mm x 8mm, AppliChrom, Oranienburg, Deutschland), bestehend aus sulfoniertem Polystyrol verwendet. Als mobile Phase diente 0,007 N H₂SO₄, bei einer Flussrate von 0,8 mL min⁻¹ bei 50 – 60 bar. Die Hydrolyseprodukte von PHB Crotonsäure (*trans*-Butensäure) und Isocrotonsäure (*cis*-Butensäure), wurden mit einem UV-Detektor bei 214 nm identifiziert. Beide Peakflächen wurden für die Berechnung berücksichtigt (**Abb. A 1**). Als Hydrolyseprodukte von Glykogen wurde Glucose mit einem Brechungsindexdetektor (Merck-Hitachi L-7490) detektiert.

3.8.2 Bestimmung der Polyhydroxyalkanoat-Zusammensetzung

Die GC-MS-Analyse wurde zur Bestimmung der Zusammensetzung von extrahiertem PHA mit dem Gerät QP2010Plus (Shimadzu; Kyoto; Japan) durchgeführt. Dafür wurde eine modifizierte Methodik, basierend auf Riis *et al.* angewendet [112]. 5 – 10 mg getrocknete Biomasse wurden mit 4 mL 1,2-Dichlorethan, 2 mL 4:1 (vol/vol) Propanol-HCl-Gemisch und 100 µL 20 g L⁻¹ Benzoesäure (internem Standard) versetzt. Die anschließende saure Propanolyse und Umesterung erfolgte für 4 h bei 120 °C in druckstabilen Reaktionsgefäßen. Anschließend wurden 4 ml Wasser dem Reaktionsgemisch zugefügt, gemischt und bis zur Phasentrennung stehen gelassen. Ca. 1000 µL der unteren (organische) Phase wurden für die GC-Analyse in entsprechende Vials überführt. Die Trennung erfolgte auf einer Stabilwax-DA--Säule (30 m x 0.53 mm, Restek, Bad Homburg, Deutschland) mit Helium als Träger bei einer Fluss von 1,44 mL min⁻¹ und einem Gradienten von 120 °C (3 min), 140 °C mit 3 °C min⁻¹, 230 °C mit 50 °C min⁻¹ und 240 °C bei 10 °C min⁻¹.

Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoßionisation. Zur Quantifizierung und Qualifizierung der propionylierten Monomere Propionyl-3HB und Propionyl-3HV wurde ein PHBV-Standard (12% 3HV, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Dabei erfolgte die Berechnung zusätzlich über das Verhältnis der Peakflächen zum internen Standard (Benzoesäure). Zur Quantifizierung wurde das TIC-Chromatogramm (Total Ion Current) und zur Qualifizierung das Masse zu Ladungsverhältnis für den jeweiligen Peak genutzt. Als Software fand die GC-MS Solution-Software Anwendung.

3.8.3 Analyse der Lipidgruppen

Die Trennung der Lipidgruppen erfolgte mittels HPLC, detektiert mit evaporierendem Lichtstredetektor (ELSD). Die Biotrockenmasse-Proben wurden dazu mit Chloroform, Methanol und H₂O im Verhältnis 2:2:1 (vol/vol/vol) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mit einer Schüttelmühle (MM200, Retsch, Haan, Deutschland). Nach der Homogenisierung wurde das Extrakt bei 10000 g für 10 min zentrifugiert (Multifuge X3R, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Chloroform-haltige Phase wurde entnommen und die Lipide durch Verdampfung des Lösungsmittels (CombiDancer, Hettich, Kirchlegern,) aufkonzentriert. Lipidklassen wurden mit einer LaChrom HPLC (Merck-Hitachi, Kyoto, Japan) nach einem in der Arbeitsgruppe entwickelten Verfahren in Anlehnung an Olsson *et al.* analysiert [120]. Eine binäre Gradientenelution bei einer konstanten Durchflussrate von 0,8 mL min⁻¹, mit den Eluenten Toluol : Isopropanol : Essigsäure : Triethylamin (A, 95:5:0.2:0.1), Isopropanol : Methanol : Essigsäure : Triethylamin (B, 60:40:0.2:0.1) und Methanol : Triethylamin (C, 100: 0.2) wurde wie folgt durchgeführt: 0-10 min 100 % A, 10-15 min 50% A 50% B, 15-18 min 50% A 50% C, 18-25 min 10% A 90% C, 25-35 min 100% A. Als stationäre Phase diente eine C₁₈-Säule (LiChrospher 100 DIOL [5 µm], 125 mm × 4 mm Merck, Darmstadt, Deutschland), mit Temperierung von 20°C.

Der ELSD wurde auf einen N₂-Druck von 3,5 bar auf 60 °C eingestellt. Die Lipidklassen wurden durch den Vergleich der Retentionszeiten mit kommerziellen analytischen Standards identifiziert und anhand von Kalibrierkurven quantifiziert. Die angegebene Klasse der Phospholipide (PL) stellt die Summe der Lipide Monogalactosyldiacylglycerol, Phosphatidylglycerol, Sulfoquinovosyldiacylglycerol, Digalactosyldiacylglycerol, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin dar.

3.8.4 Analyse der Fettsäurezusammensetzung

Die simultane Extraktion und Umesterung der Fettsäuremethylester (FAME) aus der Biomasse erfolgte in versiegelten Headspace-Fläschchen mit 3 mL 3 N methanolischer HCl und 4 mL Hexan. Anschließend wurden 3 mL H₂O hinzugefügt und das Extrakt homogenisiert. Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase in ein entsprechendes Vial überführt. Die GC-MS-Analyse wurde mit He als mobile Phase bei 48 kPa, 250 °C bei einer Durchflussrate von 7,7 mL min⁻¹ und einer SGE BPX 70-Säule (25 m x 0,32 mm, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einer QP2010Plus MS (Shimadzu; Kyoto; Japan). Zur Beurteilung wurden die Massenspektren und das für den jeweiligen Peak entsprechende Fragmentierungsmuster herangezogen.

3.9 Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration

Die Messungen der Gesamtlipidkonzentration erfolgte zur Beantwortung der Forschungsfragen um **H3** (Korrelation der Fluoreszenz mit der Lipid/TAG-Konzentration) und **H4** (Differenzierung der SL-Art).

Die Bestimmung der Gesamtlipide erfolgte durch die Sulfophosphanillin-Reaktion [118]. Dafür wurden in zwei aufeinander folgenden Schritten zuerst 25 µL der Kultursuspension in 250 µL 96 % H₂SO₄ bei 95 °C für 30 min hydrolysiert und zu der abgekühlten Probe 1000 µL SPV-Lösung (0,3 g Vanillin in 5 mL EtOH, Zugabe von 45 mL MilliQ-H₂O und 200 mL konz. H₃PO₄) zugegeben, mehrfach invertiert und für 15 min bei 37°C inkubiert (Blockthermostat BT100, Kleinfeld). Anschließend wurden 200 µL der Mixtur in 96-Well-Platten (brand pureplate 96, Brand, Wertheim, Deutschland) übertragen und die Absorption bei 530 nm im Photometer (DR6000, Hach, Loveland, USA) aufgezeichnet. Als Standardreihe wurde Rapsöl (Vegola, Netto Marken-Discount, Maxhütte-Haidorf, Deutschland) in Chloroform zu einer Stammlösung von 2,0 g L⁻¹ gelöst und verschiedene Standardlösungen durch Mischung mit Chloroform hergestellt. Standardlösungen wurden wie Proben behandelt. Auf Basis der linearen Regression der Standardlösungen erfolgte die Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration der Proben.

3.10 Datenwissenschaftliche Methoden

Systematisches Review und Metadatenanalyse (**Kapitel 3.10.1**) erfolgte im Zusammenhang mit **H2** zur Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien. Modellerstellung für Regressionsanalysen erfolgte im Zusammenhang mit **H1** und **H3**. Klassifizierungsmodelle zur Differenzierung der SL-Art wurden zur Beantwortung der **Hypothese H4** eingesetzt. Statistische Methoden (**Kapitel 3.10.3**) fanden bei allen Korrelationsstudien (**H1, H2, H3**) Anwendung. Die Bestimmung der molekularen Eigenschaften von LG2 (**Kapitel 3.10.4**) wurde genutzt, um den Farbstoff im Zusammenhang mit **H1** zu charakterisieren und zu visualisieren.

3.10.1 Systematisches Review und Metadatenanalyse

Datenanalyse, Untersuchung von Zusammenhängen und Modellierung von Datensätzen wurde mit dem Programm Orange3 umgesetzt [198]. Metadatenanalyse erfolgte zur Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien (**Kapitel 4.3.2**). Folgende Eingangsfragen wurden im Zusammenhang mit der Metadatenanalyse formuliert: „Wie hängt die PHB-Bildung in Cyanobakterien mit der Kultivierungsstrategie zusammen?“ und „Induzieren Mangelbedingungen eine gesteigerte PHB-Bildung?“. Dafür wurde eine systematisches Review durchgeführt und eine Datenbank erstellt (**Tab. A 4**). Als Literaturliteraturbank wurde auf Google Scholar zurückgegriffen. Dabei wurden ausschließlich Publikationen aus peer- review Journalen berücksichtigt, die die Schlüsselbegriffe „Cyanobacteria“, „Polyhydroxyalkanoates“ / „Polyhydroxybutyrat“ beinhalten. Die Auswertung erfolgte durch deskriptive Statistik und Entscheidungsbaumanalysen.

3.10.2 Modellierungen

Für die Modellierung wurden Regressionsmodelle und Klassifizierungsmodelle eingesetzt (**Tab. 12**). Die Erstellung der Regressionsmodelle bei den Korrelationsstudien zwischen den Fluoreszenzwerten und analytischen Referenzdaten wurde in zwei verschiedene Wegen verfolgt, die anschließend gegeneinander verglichen wurden. Zum einen erfolgte die Verrechnung des SSC mit der Fluoreszenz auf Basis verschiedener mathematischer Verrechnungen (**Abb. A 2**).

Das Ziel war es hierbei durch die Verrechnung eine Reduzierung der Dimension zu erzielen, wodurch simple lineare Regression ermöglicht wird. Andererseits wurden Modell-gestützte Analysen eingesetzt, bei denen keine vorherige Verrechnung der Daten durchgeführt wurden.

Als Bewertungskriterium wurde der Korrelationskoeffizient (Pearson R) verwendet. Weiterhin wurde die Auftragung der über das Modell ermittelten Konzentrationen gegen die Referenzdaten (Modell vs. Beobachtung) genutzt, um den Anstieg (m), das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Fehlersumme zu ermitteln. Dieses wurde mit OriginPro (OriginLab Co, Northampton, USA, Version 2020 - 2021b) umgesetzt. Regressionsmodelle fanden bei der Modellierung der PHB-Konzentration von *C. necator* (**Kapitel 4.2.4**), von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.4.1**) und der Modellierung der Lipid/TAG-Konzentration in eukaryotischen Mikroalgen (**Kapitel 4.4.3**) Anwendung.

Die Bewertung der Klassifikationsmodelle basierte auf den Evaluierungsparametern: Klassifizierungsgenauigkeit (CA), Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operator Curve, ROC), Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (Area Under the Curve, AUC) und Präzision. Die Einstellungen (Test and Score) waren: Sampling: Random, Iterationen: 100, Trainingsgröße: 90 %, geschichtet, $n_{\text{PHB}} = 29$, $n_{\text{TAG}} = 24$). Weiterhin wurde die Confusion-Matrix verwendet, um die Modelle hinsichtlich ihrer Genauigkeit in der Differenzierung zwischen den SL-Arten PHB und Lipid/TAG zu untersuchen. Mit der Confusion-Matrix wurde somit das Verhältnis der vorhergesagten zu der tatsächlichen SL-Art bestimmt und zwischen den Modellen verglichen. Verschiedene Klassifizierungsmodelle wurden für die Differenzierung der SL-Art (**Kapitel 4.5.2**) untersucht. Für die Interpretation der Metadatenanalyse zur Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.3.2**) und der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die PHB-Bildung (**Kapitel 4.3.3**) wurden zudem Entscheidungsbäume (TR) verwendet.

Tab. 12: Genutzte Modelle und deren Einstellungen. Die Modellierung wurde mit Orange3 umgesetzt.

Modelltyp	Modell	Modelleinstellungen
Klassifizierung	Entscheidungsbaum	Maximale Baumtiefe: 100, Standardeinstellungen
	Naive Bayes	Standard-Einstellungen
	Logistische Regression	Regulierungs-Typ: Ridge (L2), Stärke: C=1
	Künstliches Neuronales Netz	Anzahl Neuronen: 100, Aktivierung: ReLu, Solver: Adam, max. Iterationen: 200
	Support Vector Machines	Kernel: RBF, Toleranz; 0,001, max. Iterationen: 100
Regression	Lineare Regression	Keine Regulierung
	Künstliches Neuronales Netz	Anzahl Neuronen: 100, Aktivierung: ReLu, Solver: Adam, max. Iterationen: 200
	Support Vector Machines	Kernel: linear, Toleranz; 0,001, max. Iterationen: 100

3.10.3 Statistische Methoden

Statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm OriginPro (OriginLab Co, Northampton, USA, Versionen 2020 - 2022). Deskriptive Statistik wurde verwendet, um die Metadaten zu bewerten (**Kapitel 4.3.2**). Dafür wurde der Mittelwert (arithmetisches Mittel der Stichprobe), Modus (häufigster auftretender Wert der Stichprobe) und Median (Zentralwert der Stichprobe) genutzt. Korrelationsanalysen wurden in den **Kapiteln 4.2.2** (Analyse des Zusammenhangs von SSC und RF zur analytischen PHB-Konzentration) und **in Kapitel 4.4.1** (PHB-Bestimmung PHB-Konzentration im Screening-Maßstab) eingesetzt. Als Maß der Beurteilung diente der Korrelationskoeffizient (Pearson, R). die Analysen wurden mittels Korrelationsmatrix erstellt (OriginLab Co, Northampton, USA, Version 2022).

Statistische Signifikanztests basierten auf t-Tests und ANOVA (H_0 : Mittelwert (1) – Mittelwert (2) = 0, $\alpha = 0,1$). Zur Vorbeugung des Einflusses unterschiedlicher Homogenität und ungleicher Varianzen der Stichproben wurde die Welch-Korrektur vorgenommen. ANOVA wurde bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der Biomasse und PHB-Konzentration (**Kapitel 4.2.3**, n=12) verwendet. T-tests dienten der Beurteilung der Vergleichbarkeit zwischen zwei Stichproben und wurden bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der Biomasse und PHB-Konzentration (**Kapitel 4.2.3**, n=12), Vergleich der Genauigkeit zu Ergebnissen durch Modellgestützte Analysen (**Kapitel 4.2.4**, n=12), Effekte der Mangelbedingungen auf die PHB-

Bildung in *Leptolyngbya* sp. (**Kapitel 4.3.4**, n=20) und der Übertragung der Fluoreszenzmethode (von *C. necator*) zur PHB-Bestimmung in *Leptolyngbya* sp. (**Kapitel 4.4.1**, n=10) und Lipiden/TAGs in eukaryotischen Mikroalgen (**Kapitel 4.4.3** n=24) genutzt.

Statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) erfolgte mit dem Programm Visual xsel (CRGRAPH, Starnberg, Deutschland) und dem Plan D-Optimal. Die Eingangsvariablen sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben (Untersuchung abiotischer und biotischer Einflussgrößen bei *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255, **Kapitel: 3.3.2**; Analyse und Optimierung der Fluoreszenz-Färbeparameter, **Kapitel: 3.6.4**). Die Auswertung wurde mit der Methode Regression der partiellen kleinsten Quadrate (Partial Least Squares, PLS) durchgeführt. Die Bewertung erfolgte durch die relativen Effekte auf die jeweilige Zielgröße (Biomasse, PHB), das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Wiederholbarkeit (W^2). Die Residualverteilung diente zur Beurteilung der Streuung der PHB-Konzentrationen bei der Untersuchung der Einflussgrößen auf die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel: 3.3.2**).

3.10.4 Bestimmung der Moleküleigenschaften und chemische Strukturformeln

Die Bestimmung der Molekulareigenschaften und die Strukturformeldarstellung wurde mit Molinspiration [214], ChemSketch (ACD/ChemSketch, v2020, Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada) sowie über die Datenbank ChEMBL umgesetzt [215]. 3D-Visualisierung der Farbstoffmoleküle erfolgte mit Deep View [216].

4 Ergebnisse

Für die Beantwortung der eingangs aufgestellter Hypothesen und Fragestellungen (**Kapitel 2**) wurden die Ergebnisse in fünf Kapitel gegliedert. Für die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens von LG2 und PHB in *C. necator* (**H1**) wurden die molekularen Eigenschaften des Farbstoffes bestimmt (**Kapitel 4.1**) sowie die abiotischen und biotischen Einflussgrößen auf den Färbeprozess analysiert (**Kapitel 4.2**). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden anschließend Korrelationsanalysen vorgenommen und die entwickelte Fluoreszenzmethode hinsichtlich der Reproduzierbarkeit untersucht.

Für die Analyse des Effektes der mixotrophen Kultivierung auf die PHB-Bildung und SL-Zusammensetzung (**H2**) wurden geeignete Kultivierungsbedingungen durch eine Metadatenanalyse evaluiert und anschließend biotische und abiotische Faktoren kombinatorisch, sowie Mangel-Bedingungen in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 untersucht (**Kapitel 4.3**). Die PHB-Bildung wurde zusätzlich auf genetischer und Produktebene analysiert.

Die mit *C. necator* entwickelte Fluoreszenzmethode wurde anschließend auf SL-produzierende Mikroalgen angewandt, um eine Beurteilung des Einflusses der phylogenetischen Distanzen und zellmorphologische Unterschiede auf die SL-Bestimmung mit LG2 vornehmen zu können (**H3**). Dafür wurden drei eukaryotische Mikroalgen als Lipid/TAG-Bildner und *Leptolyngbya* sp. als PHB-Produzent untersucht (**Kapitel 4.4**).

Die in den **Kapiteln 4.2 - 4.4** erhobenen Fluoreszenzdaten wurden anschließend genutzt, um eine *in situ*-Differenzierung der SL-Art auf Basis der LG2-Fluoreszenz durchzuführen (**H4**). Dafür wurden Häufigkeitsanalysen und Modell-gestützte Klassifizierungen eingesetzt (**Kapitel 4.5**).

4.1 Charakterisierung von LipidGreen2

Zur Untersuchung der Eignung von LG2 zur Detektion von PHB in *C. necator* (**H1**) wurden die physikochemischen Eigenschaften des Farbstoffs untersucht. Dafür wurde das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit der Anregung und Emission (**Kapitel 4.1.1**), die Quantenausbeute (**Kapitel 4.1.2**) und das Stabilitätsverhalten des Farbstoffes (**Kapitel 4.1.3**) im Vergleich zum Referenzfarbstoff NR betrachtet.

4.1.1 Identifizierung der spektralen Bereiche von LipidGreen2

Solvatochrome Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe LG2 und NR wurden durch 3DEEM-Spektren mit PBS-Puffer als polarer und PHB-akkumulierenden *C. necator* als lipophiler Umgebung aufgezeichnet (**Abb. 11**). Ideale Exzitationsbereiche für die PHB-Detektion wurden bei 420 – 450 nm (LG2) und 500 – 550 nm (NR) detektiert. Unter polaren Bedingungen verschoben sich sowohl Anregungs- als auch Emissionsmaxima bathochrom. So wurde die höchste Fluoreszenzintensität bei LG2 unter polaren Bedingungen bei einer Anregung von 460 nm und die Emission bei 560 nm detektiert. Ähnliche Resultate wurden mit NR erzielt. Messungen mit NR ergaben die höchsten Intensitäten bei einer Exzitation von 590 nm und einer Emission von 660 nm unter polarer Umgebung. Im Vergleich zu NR zeigte LG2 bei gleichen Ausgangskonzentrationen geringere Emissionsintensitäten sowohl in der polaren als auch in der lipophilen Umgebung. Der Anregungsbereich von NR während der Bestimmung von PHB war größer als der von LG2 und erstreckte sich von 460 - 580 nm. Bei LG2 lag dieser im Bereich zwischen 400 – 450 nm.

Die Exzitationswellenlängen zeigten zudem eine gute Eignung für die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von PHB-akkumulierenden Zellen (**Abb. 11 C, D**). Um Interferenzen zwischen der Anregung und dem Emissionssignal zu vermeiden, wurden für nachfolgende Experimente 440 nm (LG2) und 525 nm (NR) als Exzitationswellenlängen definiert und der Emissionsscan beginnend 20 nm nach der Exzitation aufgezeichnet.

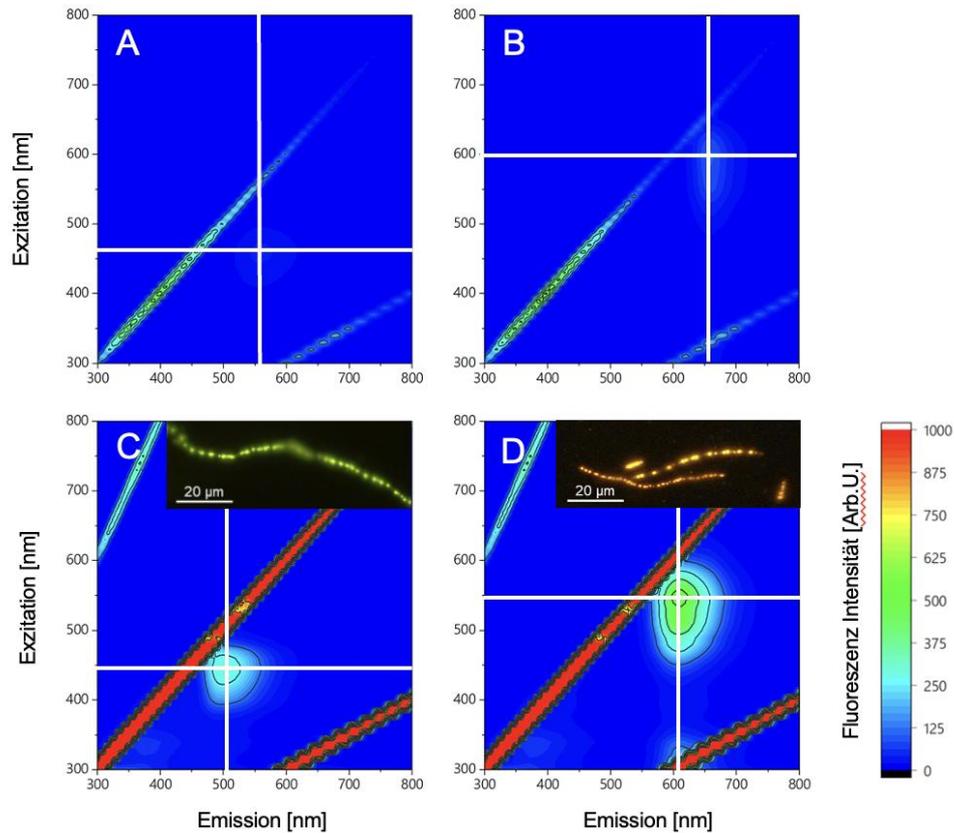


Abb. 11: Exzitation-Emissions-Matrix von LipidGreen2 (**A, C**) und Nile red (**B, D**) in polarer (PBS-Puffer) (**A, B**), in lipophiler Umgebung (Polyhydroxybutyrat-Akkumulation in *C. necator*) sowie fluoreszenzspektroskopische Aufnahmen der Zellen (**C, D**). Das weiße Kreuz markiert die maximale Fluoreszenzintensität.

4.1.2 Bestimmung der Fluoreszenzeffizienz

Die Effizienz der Fluoreszenz (Quantenausbeute) dient als Maß zur Bestimmung der Fluoreszenz-Effizienz und wird über das Verhältnis absorbierter zu emittierten Photonen berechnet. Dabei ergaben sich Absorptionsmaxima (in DMSO) von 445 nm für LG2 und 548 nm für NR. Das Absorptionsmaximum wurde anschließend als Exzitationswellenlänge bei der Fluoreszenzmessung verwendet, wobei Emissionsmaxima von 518 nm für LG2 und 626 nm für NR detektiert wurden (**Abb. 12**). Durch die Auftragung der gemessenen maximalen Absorptionsintensitäten und der Fluoreszenzemissions-Intensitäten ergaben sich Geradenanstiege von $193,8 \pm 9,9$ (LG2) bzw. $212,9 \pm 13,6$ (NR) (**Abb. 12 C**).

Das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,9922 und 0,9879 für LG2 bzw. NR. Die Quantenausbeute wurde anschließend aus dem Verhältnis der Anstiege berechnet. Dabei diente die bekannte Quantenausbeute von NR (0,29) als Referenzwert [217]. Die Quantenausbeute von LG2 betrug demnach 0,26.

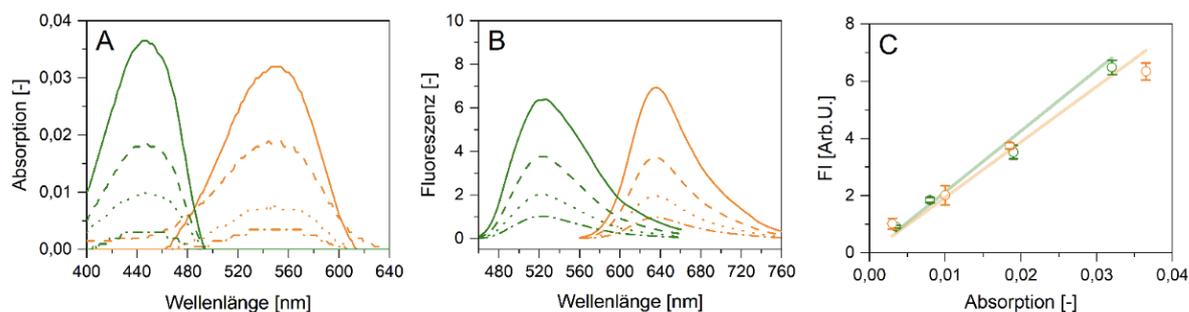


Abb. 12: Bestimmung der Quantenausbeute von LipidGreen2 und Nile red. Absorptions-Scan (A), Fluoreszenzscan am Absorptionsmaximum als Exzitationswellenlänge (LipidGreen2: 445 nm, Nile red: 548 nm) (B), Auftragung der Fluoreszenz gegen die Absorption (C). Eingestellte Absorptionen (A-B): Punkt-Striche: 0,005, Punkte: 0,01, Striche: 0,02; Durchgezogene Linie: 0,04. LipidGreen2: grün, Nile red: orange. Die Farbstoffe waren in DMSO

4.1.3 Stabilitätsuntersuchungen

Um die Effekte der Inkubationszeit auf die Fluoreszenz zu analysieren, wurden Langzeitmessungen über einen Zeitraum von 600 min bei einer diskontinuierlichen Bestrahlung (6 min^{-1}) durchgeführt (Abb. 13 A, D). Die LG2-Fluoreszenzintensität sank im polaren Bereich innerhalb der ersten 20 min um 20% und blieb dann bis zum Ende der Messung fast konstant. In lipophiler Umgebung stieg die Intensität an und erreichte nach 120 min das Maximum. Anschließend verringerte sich die Intensität bis zum Ende des Experimentes geringfügig und wies eine prozentuale Differenz von 16 % zum Intensitäts-Maximum auf.

Die Fluoreszenz-Intensität von NR zeigte einen anderen Verlauf. In polarer Umgebung folgte diese einer logarithmischen Abnahme, welche sich über den Messverlauf bis zum Ende um 84% verringerte (Abb. 13 A). In lipophiler Umgebung stieg die Intensität zu Beginn stark an und erreichte nach 27 min das Maximum (Abb. 13 D). Anschließend sank die Intensität ähnlich wie in polarer Umgebung logarithmisch und resultierte zum Ende des Experimentes in 29 % der maximalen Intensität.

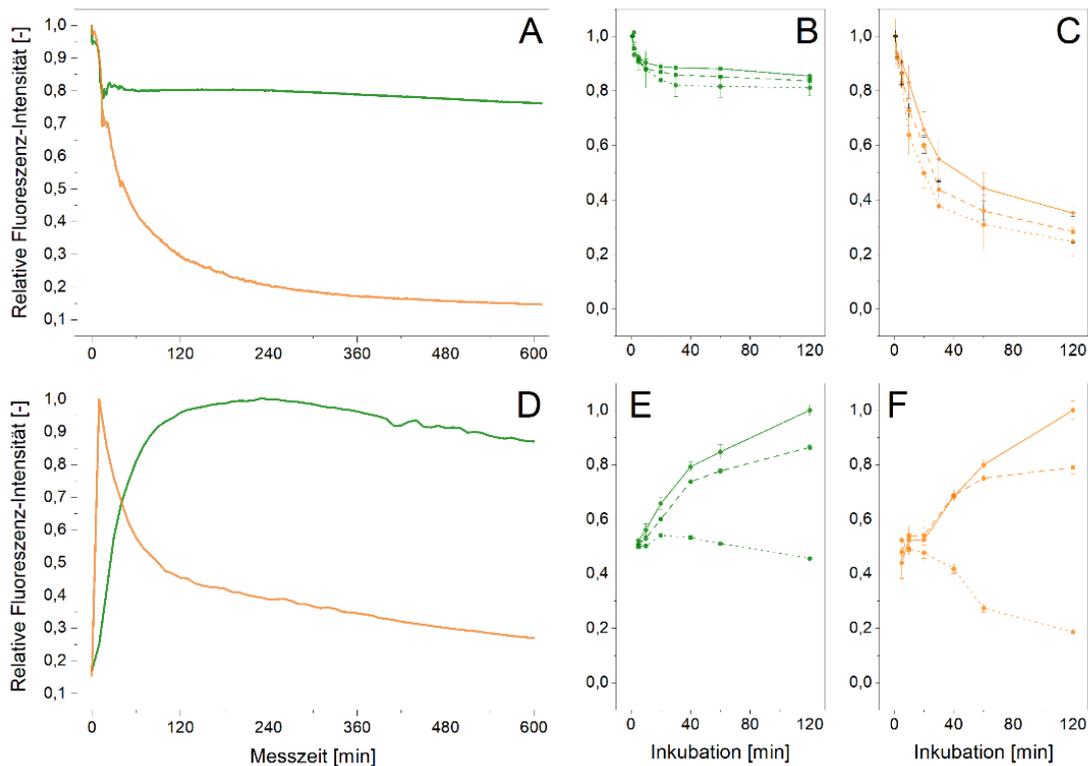


Abb. 13: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von LipidGreen2 (grün) und Nile red (orange) unter polarer Umgebung (**obere Reihe**) und in Polyhydroxybutyrat-akkumulierenden *Cupriavidus necator* Zellen als lipophile Umgebung (**untere Reihe**). **A, D:** Langzeitstabilitätsmessung bei diskontinuierlicher Bestrahlung (6 min^{-1}). **B, C, E, F:** Auswirkungen unterschiedlicher Beleuchtungsintensitäten in Abhängigkeit der Inkubationszeit: durchgehende Linie: $0 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, gestrichelte Linie: $10 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, gepunktete Linie: $100 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Zur Untersuchung des Einflusses des Umgebungslichtes auf die Inkubation zwischen der Probe und dem Fluoreszenzfarbstoff wurden die Proben unterschiedlich lange bei verschiedenen Lichtintensitäten inkubiert und anschließend das Fluoreszenzsignal gemessen. Unter polaren Bedingungen waren keine feststellbaren Änderungen der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Belichtung bei LG2 feststellbar. Ähnlich wie bei der Langzeitmessung folgte die Fluoreszenzintensität einem logarithmischen Verlauf. Im Vergleich dazu kam es zu einer Verlangsamung der Fluoreszenzintensitäts-Zunahme mit Erhöhung der Belichtungs-Intensität unter lipophilen Bedingungen. Diese unterschied sich jedoch in den ersten 20 min zwischen der Inkubation unter Lichtausschluss ($0 \text{ } \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$) und unter Raumlicht ($10 \text{ } \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$) nur gering.

Eine hohe Umgebungsbeleuchtung ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wirkte sich ab einer Inkubationszeit von 10 min negativ auf die Fluoreszenzintensität aus. Die Messungen mit dem Farbstoff NR folgten einem vergleichbaren Bild. Im polaren Milieu zeigte sich eine Inkubationszeit-abhängige logarithmische Verringerung der Fluoreszenzintensität. Die Beleuchtung spielte dabei eine untergeordnete Rolle. Im Vergleich zu LG2 kam es jedoch zu einer erhöhten Reduktion der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Beleuchtungsstärke. Am Ende der Messungen betrug der Intensitätsverlust mehr als 71 %. Bei LG2 lagen diese bei 19% (**Abb. 13 B, C**). Bei dem Färbeprozess von PHB in *C. necator* ergab sich wie bei LG2 ein Zusammenhang der Fluoreszenzintensität mit der Beleuchtungsstärke und Inkubationszeit. Bis zu einer Inkubation von 40 min waren keine messbaren Unterschiede zwischen der Inkubation unter Lichtausschluss und unter Raumlicht erkennbar. Starklicht hingegen zeigte einen hohen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Dabei verringerte diese sich mit Zunahme der Inkubationszeit um 80 %, während der Abfall bei LG2 42 % betrug. Die Inkubation bei Raumlicht ergab einen messbaren negativen Effekt ab einer Inkubationszeit von 60 min.

4.2 *In situ*-Bestimmung von Polyhydroxybutyrat und Biomasse in *Cupriavidus necator* durch Fluoreszenzspektroskopie

Neben der Beurteilung der physikalisch-chemischen Eigenschaften von LG2 (**Kapitel 4.1**) wurden zur Beantwortung von **H1** die Auswirkungen von biotischen und abiotischen Faktoren auf den fluoreszenzspektroskopischen Färbeprozess untersucht (**Kapitel 4.2.1**). Anschließend wurden durch Korrelationsuntersuchungen Kalibrierungsmodelle entwickelt (**Kapitel 4.2.3**) und deren Reproduzierbarkeit unter verschiedenen Mangelbedingungen geprüft (**Kapitel 4.2.4**). In diesem Zusammenhang wurde das Verhältnis zwischen Streulicht und Rohfluoreszenz analysiert. Anschließend wurden die Resultate zur Bestimmung von PHB und Biomasse mit Modell-gestützten Analysen gegenübergestellt (**Kapitel 4.2.5**).

Ein differenziertes Schema war erkennbar, wenn die Inkubationszeit als Zielgröße definiert wurde (**Abb. 14 B**). Die Ausprägungen der Effekte der Farbstoffe LG2 und NR unterschieden sich wesentlich von BY. Der Puffertyp spielte bei allen Farbstoffen eine zu vernachlässigende Rolle (PBS I: 0, PBS II: 0 - 0,2). Die Farbstoffkonzentration von LG2 und NR wies, wie bei der Zielgröße Fluoreszenzintensität, den höchsten Einfluss auf die Inkubationszeit auf. Der Effekt zwischen den beiden Farbstoffen war indes identisch (beide 1,0). Daraus resultierte ebenfalls eine höhere Wechselwirkung zwischen der Farbstoffkonzentration und dem Puffer (0,4), sowie zwischen der Farbstoffkonzentration und den Carrier-Solvents (0,3). NR zeigte zudem im Vergleich zu LG2 eine stärkere Beeinflussung von den Carrier-Solvents (DMSO und Isopropanol) und der Interaktion zwischen der Biomasse und der Farbstoffkonzentration (0,3). Wie bei der Zielgröße der Fluoreszenzintensität wirkte die Biomassekonzentration bei LG2 und NR auf die Inkubationszeit ein (beide: 0,4). Das Maß des Einflusses der einzelnen Parameter war indes höher als die Wechselwirkungen zwischen diesen.

Das Schema von BY war hingegen wesentlich von den Wechselwirkungen der Parameter geprägt. Lediglich DMSO zeigte den gleichen Effekt auf die Inkubationszeit (0,4), wie bei NR. Ebenso zeigte der Puffertyp einen geringen Einfluss auf die Inkubationszeit (PBS II 0,2). Die Biomassekonzentration, der Farbstoff sowie die Interaktion zwischen den beiden Parametern hatten einen geringen Einfluss auf die Inkubationszeit. Isopropanol zeigte den größten Effekt als Parameter in den Wechselwirkungen zu den Parametern Biomasse (0,6), Puffer (1,0), Farbstoffkonzentration (0,5) und DMSO (0,35). Ebenfalls spielte die Interaktion zwischen DMSO und der Farbstoffkonzentration (0,7) eine wichtige Rolle auf die Inkubationszeit.

Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass das Einflusschema auf die Fluoreszenzintensität sich nicht wesentlich zwischen den untersuchten Farbstoffen unterschied und maßgeblich durch Farbstoffkonzentration geprägt wurde. Das Einflusschema auf die Zielgröße Inkubationszeit unterscheidet sich indessen wesentlich zwischen den Farbstoffen, wobei bei den solvatochromen Farbstoffe LG2 und NR ein ähnliches Verhalten festgestellt werden konnte. Die Inkubationszeit mit BY war wesentlich geprägt von den Wechselwirkungen der Parameter, während die Farbstoffkonzentration und Biomassekonzentration die Inkubationszeit mit LG2 und NR maßgeblich beeinflussten.

Basierend auf den Ergebnissen wurden die Färbebedingungen für die Inkubationszeiten 1 min, 5 min und 10 min mit der Zielgröße der maximalen Fluoreszenzintensität durch das Optimierungstool der Software Visual Xsel ermittelt (**Tab. 13**). Dabei spiegelten die resultierenden Parameterkonstellationen die zuvor gewonnenen Erkenntnisse wider.

Tab. 13: Resultierende Färbebedingungen in Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbstoffe und Inkubationszeit basierend auf den Parameteroptimierungstools (Visual Xsel). [c]: Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs; [DMSO], Dimethylsulfoxid; [Isop], Isopropanol; t, Inkubationszeit. Puffertypen: saliner Phosphatpuffer, PBS I und PBS II, PBS I mit 0,03 mg L⁻¹ EDTA, und 0,08 mg L⁻¹ Tris; pH 7,5.

Farbstoff	t [min]	c [µg mL ⁻¹]	Puffer Typ	Kultur [µL]	[DMSO] [%]	[Isop] [%]
BODIPY ^{493/503}	1	0.2	PBS II	500	10	9
	2	0.2	PBS II	500	10	10
	5	0.2	PBS II	500	9	10
	10	0.2	PBS II	500	5	10
LipidGreen2	1	2.0	PBS I	250	10	0
	2	1.7	PBS I	250	10	0
	5	1.0	PBS II	500	10	0
	10	1.1	PBS II	500	5	0
Nile red	1	1.4	PBS II	500	10	0
	2	1.3	PBS II	500	10	0
	5	1.0	PBS II	500	10	0
	10	1.0	PBS II	500	5	5

Ein Isopropanol-Anteil von 10 % förderte die maximale Fluoreszenz bei BY unabhängig von der Inkubationszeit. Die Farbstoffkonzentration (0,2 µg mL⁻¹) in Kombination mit dem Puffertyp PBS II sowie ein gleichbleibendes Kulturprobenvolumen (500 µL) waren unabhängig von der Inkubationszeit einsetzbar. Währenddessen reduziertes sich der Anteil von DMSO ab 5 min Inkubationszeit. Bei LG2 und NR war eine größere Ausprägung der Trends mit Zunahme der Inkubationszeit feststellbar. Dabei nahm die Konzentration des Farbstoffs bei Verkürzung der Inkubationszeiten zu und das Probevolumen der Kultursuspension ab.

Der Trend war bei LG2 im Vergleich zu NR stärker ausgeprägt. Zur Erzielung maximaler Fluoreszenzintensitäten bei Inkubationszeiten geringer als 5 min bedurfte es einer höheren Farbstoffkonzentration von LG2 (z.B. $1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei 2 min) als bei NR (z.B. $1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei 2 min). Durch den Optimierungstool erwies sich der Puffertyp PBS II für BY und NR als Inkubationszeit-unabhängig geeignet, während für LG2 sowohl PBS I (1 – 2 min) und PBS II (5-10 min) ermittelt wurde.

Unter Einbeziehung der Erreichung einer höchstmöglichen Fluoreszenzintensität konnte unter Berücksichtigung der Farbstoffkonzentration eine minimale Inkubationsdauer von 5 min bei allen drei untersuchten Farbstoffen festgestellt werden (**Abb. A 2**). Bei BY trat bereits nach 2 min eine maximale Intensität auf. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für Folgeexperimente eine Inkubationszeit von 5 min für alle Farbstoffe definiert.

4.2.2 Korrelationsanalysen und Erstellung von Kalibrierdaten

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des entwickelten Färbeprotokolls wurde eine N-Mangelkultur (*C. necator*) über einen Zeitraum von 84 h beprobt und die Fluoreszenz mit der PHB-Konzentration verglichen. Dabei wurde der SSC und die RF aufgezeichnet.

Der SSC wies eine starke lineare Beziehung zu der gravimetrisch bestimmten Zellkonzentration unabhängig von den genutzten spektralen Einstellungen des jeweiligen Farbstoffs auf. Die Steigungen der SSC-Intensitäten unterschieden sich geringfügig zwischen den spektralen Einstellungen von BY (1073,4) und LG2 (1022,2) (**Abb. 15**). Für NR (283,3) war diese jedoch wesentlich geringer. Die linearen Gleichungen, die sich aus den Regressionsmodellen ergaben, wurden in Folgeexperimenten zur Bestimmung der Biomasse verwendet. Die Analyse des Zusammenhangs zwischen RF und SSC wurde durch Korrelationsstudien umgesetzt. Dabei kamen verschiedene Verrechnungsmethoden zwischen SSC und RF zum Einsatz (**siehe Kapitel 3.6.5, Tab. A 1**).

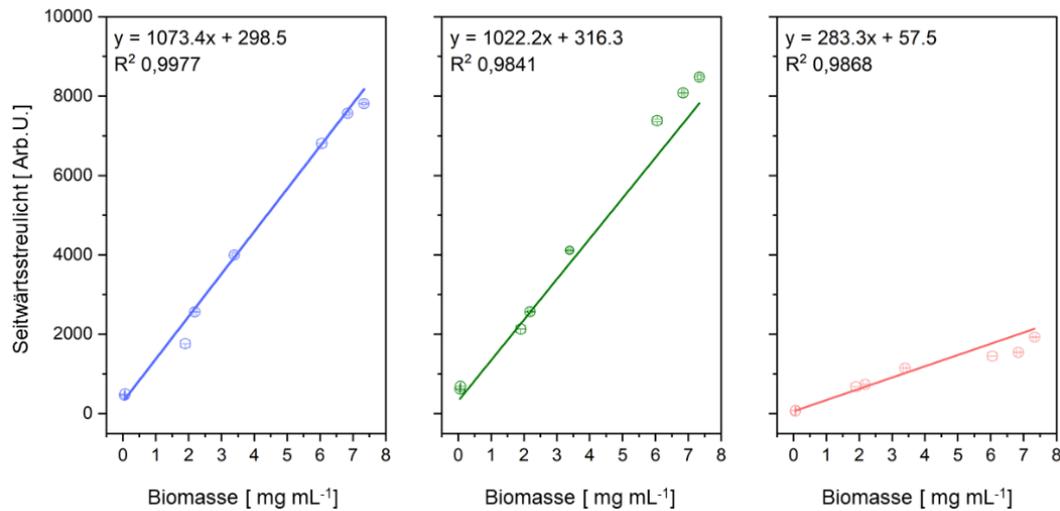


Abb. 15: Lineare Regression des Seitwärtsstreulichtes zur Biomassekonzentration mit den spektralen Einstellungen von BODIPY^{493/503} (blau), LipidGreen2 (grün) und Nile red (orange). Das Bestimmtheitsmaß (R²) ist in den Diagrammen angegeben. Fehlerbalken stellen die Standardableitung von 3 Replikaten dar.

Lineare Beziehungen zur PHB-Konzentration konnten dabei mit RF erzielt werden. Die höchste Korrelation ergab sich dabei mit LG2 (0,974), während Messungen mit BY (0,922) und NR (0,926) in niedrigere lineare Beziehungen resultierten (**Abb. 16**). Durch die Berücksichtigung des SSC konnte die Korrelation erheblich gesteigert werden. Bei BY konnte durch Anwendung von HM oder S_PR die höchsten Korrelationskoeffizienten ermittelt werden (beide: 0,985). Im Gegensatz dazu führten DI, QU sowie S_DI und S_QU zu negativen Korrelationen.

Im Vergleich zu den anderen beiden Farbstoffen ergaben sich bei LG2 alle Korrekturverfahren, außer S_QU und S_DI, in Korrelationskoeffizienten größer als 0,933. Wie bei BY ergaben sich mit QU und S_QU negative Korrelationen. Die höchsten positiven linearen Zusammenhänge wurden mit HM (0,993) und S_PR (0,996) erzielt. Die höchsten positiven Korrelationswerte mit NR ergaben sich mit HM (0,985), PR (0,986) und S_PR (0,967). Wie bei BY oder LG2 resultierten negative Zusammenhänge bei QU oder S_QU. Durch die durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass unabhängig vom Farbstoff eine Kombination aus SSC und RF zu höheren linearen Beziehungen zur Konzentration von PHB führt als die alleinige Verwendung von RF. Die meisten Korrekturmethode zeigen dabei positive lineare Zusammenhänge.

Im Gegensatz dazu ergaben QU und S_QU bei allen Farbstoffen sowie DI und S_DI bei BY negative Zusammenhänge. Da HM und S_PR für alle Farbstoffe die höchsten Korrelationen aufwiesen, wurden diese Varianten für weitere Experimente angewandt und hinsichtlich der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Gesamtmethodik (**Kapitel 4.2.3**) eingesetzt.

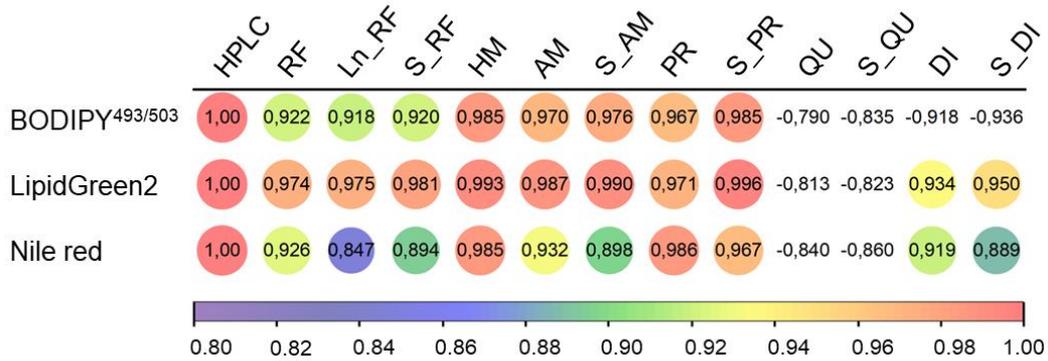


Abb. 16: Korrelationsmatrix korrigierter Fluoreszenzwerte im Vergleich zur Polyhydroxybutyrat-Konzentration. Korrekturen erfolgten durch Verrechnung der Fluoreszenz (RF) mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC): Ln_, Logarithmus von_; S_, Quadratwurzel von_; HM, harmonischer Mittelwert von RF und SSC; AM, arithmetisches Mittel aus SSC und RF; PR, Produkt aus SSC und RF; QU, Quotient aus RF zu SSC; DI, Differenz aus RF und SSC. Zur besseren Visualisierung wurden die Werte falsch-gefärbt dargestellt. Angegeben ist die Pearson-Korrelation.

4.2.3 Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methodik zu untersuchen, wurden die zuvor erstellten Regressionsmodelle für die SSC-basierte Biomassebestimmung (**Kapitel 4.2.2**) verwendet, um an N-Mangel, P_i-Mangelkultur und eine NaCl-gestresste Kultur *C. necator* Kulturen die Biomasse zu bestimmen. Die Biomassebestimmung durch SSC (auf Basis der Kalibrierdaten aus **Kapitel 4.2.2**) erzielte eine hohe Genauigkeit zu den analytischen Referenzwerten unter den spektralen Einstellung von BY und LG2 (**Abb. 17**). Zwei-Wege-ANOVA-Analysen bestätigten, dass die Variablen "Farbstoff" und "Kultur" sich nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,4943$). Tatsächlich unterschieden sich die Mittelwerte innerhalb der Gruppe "Kulturen" ($p = 0,425$) und des "Farbstoffs" ($p = 0,4969$) ebenfalls nicht signifikant voneinander.

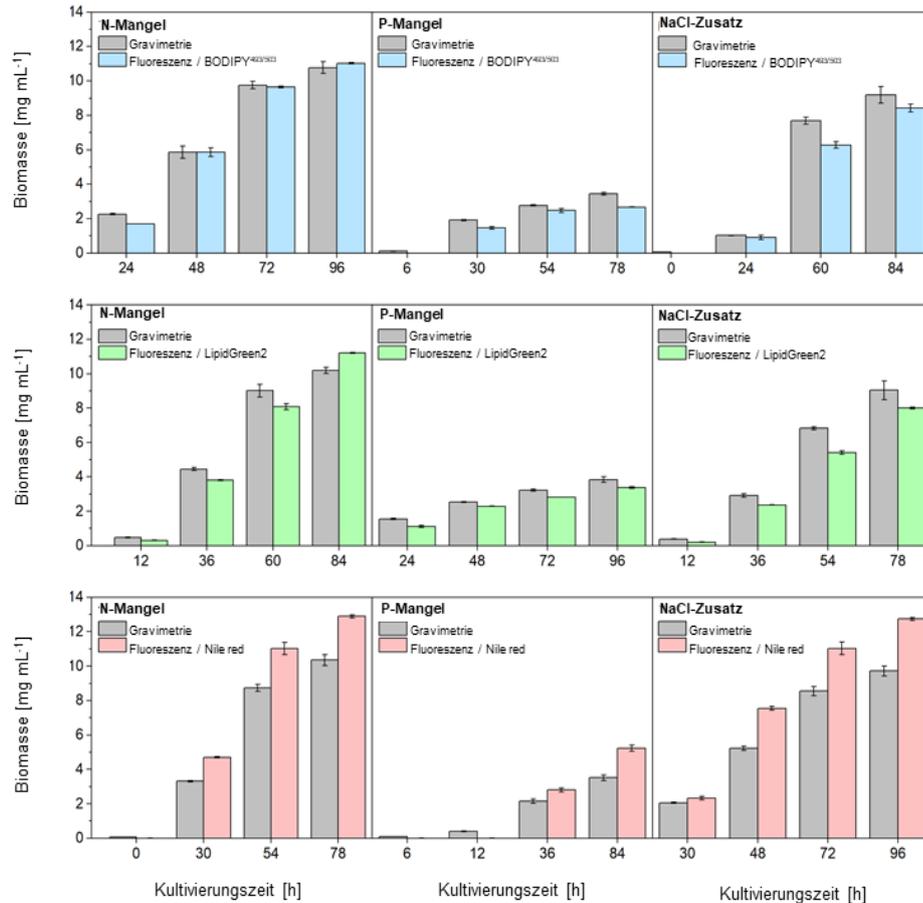


Abb. 17: Biomassekonzentrationen ermittelt durch Seitwärtsstreulicht unter Verwendung der erstellten Regressionen (**Kapitel 4.2.2**) im Vergleich zur gravimetrischen Analyse (graue Balken). Verwendung der spektralen Einstellungen von BODIPY^{493/503} (blau), LipidGreen2 (grün) und Nile red (rot). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Wiederholungen dar.

Die höchste Übereinstimmung zwischen der gravimetrisch-gemessenen Biomasse und der durch SSC ermittelten Daten wurden jedoch mit der N-Mangel-Kultur bei BY ($T(6) = 0,034$, $p = 0,9738$) und LG2 ($T(6) = 0,055$, $p = 0,9579$) erzielt. Mit der N-Mangel-Kultur ergaben sich somit Übereinstimmungen von 94 % zur analytischen Referenz. Im Vergleich dazu war die Übereinstimmung im roten spektralen Bereich (NR) mit 87 % wesentlich geringer. Dieses konnte durch den t-Test bestätigt werden (**Tab. 14**). Die Übereinstimmung der durch SSC ermittelten Biomassekonzentrationen zur gravimetrischen Messung unter Berücksichtigung aller Kulturen und Messpunkte betrug 85 % für die spektralen Einstellungen von BY, 84 % für LG2 und 76 % für NR.

Tab. 14: p-Werte aus t-Tests der durch das Seitwärtsstreulicht ermittelten Biomasse-Konzentrationen zu den analytischen Referenzdaten.

Farbstoff	Kultur	p-Wert
BODIPY ^{493/503}	Alle Datenpunkte	0,8262
	N-Mangel	0,9738
	P _i -Mangel	0,6790
	NaCl-Stress	0,8558
LipidGreen2	Alle Datenpunkte	0,7898
	N-Mangel	0,9579
	P _i -Mangel	0,5916
	NaCl-Stress	0,7695
Nile red	Alle Datenpunkte	0,5087
	N-Mangel	0,7002
	P _i -Mangel	0,7647
	NaCl-Stress	0,5067

Mithilfe der Regressionsmodelle, welche aus der Kalibrierungskultur für die Bestimmung des PHB-Gehalts abgeleitet wurden (**Kapitel 4.2.2**), erfolgte die Ermittlung der PHB-Konzentration anhand von HM und S_PR. Anschließend wurde diese mit den Ergebnissen von RF sowie den analytischen Werten verglichen (**Abb. 18**). Um zu untersuchen, wie sich der Mittelwert der PHB-Konzentration in Bezug auf die Variablen Fluoreszenzfarbstofftyp, Art der Kultur und Korrekturmethode verhält, wurde eine Drei-Wege-ANOVA durchgeführt. Die statistische Auswertung ergab, dass die Genauigkeit der PHB-Konzentrationsbestimmung durch Fluoreszenz von der Art des Farbstoffs abhängt ($p = 0,0209$). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Kulturen ($p = 0,2502$) oder der Wahl der Korrekturmethode ($p = 0,1344$) festgestellt. Einzelne t-Tests ergaben, dass die Verwendung von LG2 als Farbstoff in Verbindung mit HM zu einer höheren Genauigkeit im Vergleich zu den anderen Farbstoffen führte (**Tab. 15**).

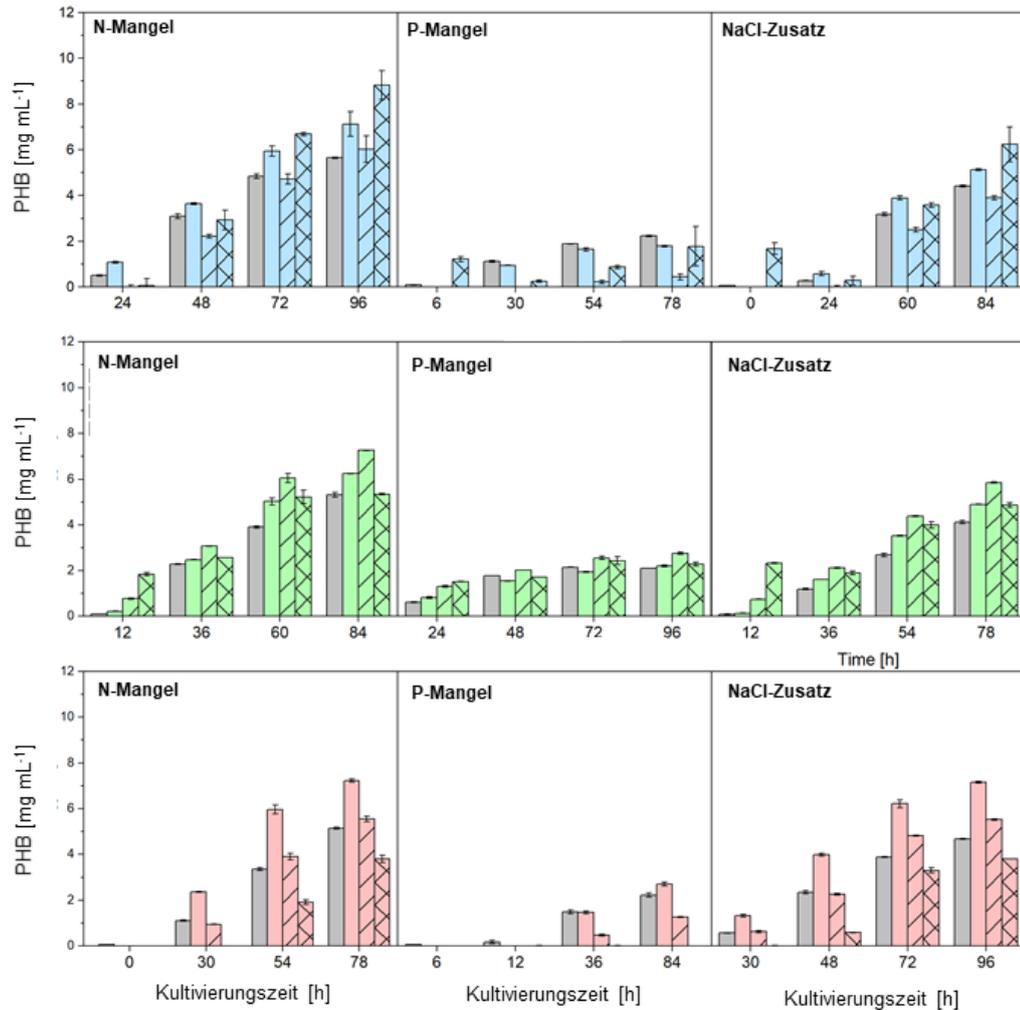


Abb. 18: Berechnete Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen mit den korrigierten Fluoreszenzwerten von BODIPY^{493/503} (blau), LipidGreen2 (grün) und Nile red (rot) bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen verglichen zu den Referenzwerten (grau). Die Rohfluoreszenz (RF) (gekennzeichnete Balken) wurde durch das harmonische Mittel mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC) (einfarbig) und der Wurzel des Produktes aus RF und SSC (gestrichelte Balken) korrigiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen dar.

Die Methode S_PR eignete sich für BY und NR besser als HM. Unter Berücksichtigung aller Kulturen konnte die höchste Übereinstimmung zu den analytischen Referenzwerten mit NR und S_PR erzielt werden ($T(22) = -0,026$, $p = 0,9473$), gefolgt von LG2 mit der Korrektur durch HM ($T(22) = -0,487$, $p = 0,7312$) und BY mit S_PR ($T(22) = 0,567$, $p = 0,7248$).

Tab. 15: t-Tests der durch Fluoreszenz ermittelten Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen und den analytischen Referenzwerten. HM: Harmonisches Mittel aus Seitwärtsstreulicht (SSC) und Fluoreszenz (RF), S_PR: Quadratwurzel aus dem Produkt von SSC und RF. Angegeben ist der p-Wert.

Farbstoff	Kultur	HM	S_PR	RF
BODIPY ^{493/503}	alle	0,6872	0,7248	0,5670
	N-Mangel	0,6172	0,8761	0,6400
	P _i -Mangel	0,7155	0,6143	0,0530
	NaCl-Stress	0,7902	0,8213	0,5871
LipidGreen2	alle	0,7312	0,1961	0,2126
	N-Mangel	0,8486	0,4820	0,5812
	P _i -Mangel	0,9513	0,3372	0,4575
	NaCl-Stress	0,7168	0,4173	0,3119
Nile red	alle	0,2651	0,9473	0,1782
	N-Mangel	0,4934	0,9203	0,5218
	P _i -Mangel	0,9488	0,4049	0,1565
	NaCl-Stress	0,3029	0,7746	0,4997

4.2.4 Untersuchung der Reproduzierbarkeit durch modellgestützte Methoden

Im Gegensatz zu den korrigierten Fluoreszenzwerten, die durch die Verrechnung von RF und SSC ermittelt wurden, wurde zudem der Zusammenhang mittels Modell-gestützter Methoden untersucht (**Abb. A 3**). Hierbei wurden die Daten der Kalibrierung für das Modellerstellung herangezogen, wie bereits im vorherigen Abschnitt (**Kapitel 4.2.2**). Als Modelle wurden die lineare Regression (LR), Künstliche Neuronale Netzwerke (KNN) und Support Vector Machines (SVM) eingesetzt, wobei die Fluoreszenzsignale Intensität und Fläche (Fläche des Emissionssignals) vergleichend berücksichtigt wurden.

Der höchste Korrelationskoeffizient ergab sich bei BY und LG2 mit LR (**Tab. 16**). Die Verwendung der Intensität als Fluoreszenzsignal führte zu geringfügig höheren Koeffizienten. Ein höherer Korrelationskoeffizient für NR wurde unter Verwendung von KNN erzielt. Unabhängig vom Farbstoff erwies sich SVM als das am wenigsten geeignete Kalibrierungsmodell für die PHB-Modellierung mit *C. necator*.

Tab. 16: Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungsmodelle zur Bestimmung der Polyhydroxybutyrat-Konzentration durch Fluoreszenz und Methoden durch die Modelle: Lineare Regression (LR), Künstliches neuronales Netzwerk (KNN) und Support Vector Machines (SVM) unter Berücksichtigung der Fluoreszenz und des Seitwärtsstreulichts. FI: Fluoreszenzsignal: Int: Intensität bei 510 nm, A: Emissionsfläche (460 -660 nm).

Farbstoff	FI	LR	KNN	SVM
BODIPY ^{493/503}	Int	0,955	0,906	0,482
	A	0,948	0,901	0,757
LipidGreen2	Int	0,966	0,928	0,737
	A	0,962	0,938	0,738
Nile red	Int	0,938	0,963	0,679
	A	0,929	0,961	0,697

Anschließend wurden die PHB-Konzentrationen der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen (N-Mangel, P_i-Mangel, NaCl-Stress, **Kapitel 4.2.3**) durch das Modell LR ermittelt und hinsichtlich des Anstieges (m), des Bestimmtheitsmaßes (R²) und der Fehlersumme durch die Auftragung der Modellwerte gegen Referenzwerte (Beobachtungen) untersucht (**Abb. 19**).

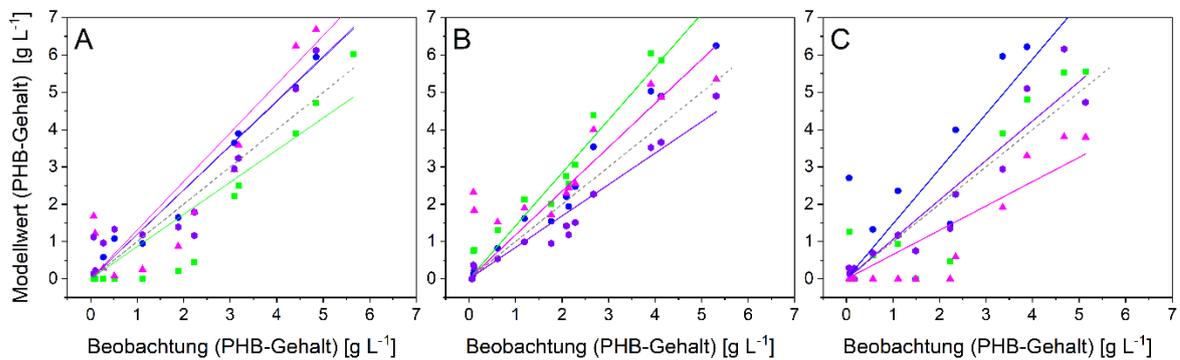


Abb. 19: Auftragung der durch Fluoreszenz modellierten Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen gegen die analytischen Referenzdaten mit den Farbstoffen BODIPY^{493/503} (**A**), LipidGreen2 (**B**) und Nile red (**C**). Berechnung über das harmonische Mittel aus Rohfluoreszenz und Seitwärtsstreulicht (blau), Quadratwurzel des Produktes aus beiden (grün), Modell Lineare Regression (violett) im Vergleich zu der Berechnung über Rohfluoreszenz (pink).

Dabei wurde festgestellt, dass die Präzision der Berechnung mittels LR unabhängig von den verwendeten Farbstoffen hoch war (**Tab. 17**). Für BY betrug der Anstieg 1,19, was dem Wert entspricht, der bei der Berechnung über HM erzielt wurde. Die Methode S_PR war geringfügig genauer als das LR-Modell (R^2 0,9745) oder HM (R^2 0,9669) mit einer Abweichung von 0,14 (zum Optimum 1,0) und einem R^2 von 0,9844. Die Modellierung mit LG2 ergab bessere Werte über LR (R^2 0,9877, m 0,99) im Vergleich zur Korrektur durch HM (R^2 0,9897, m 1,18) oder S_PR (R^2 0,9855, m 1,42). Bei NR waren die Daten des LR-Modells ähnlich zu denen mit der S_PR-Korrektur. Jedoch zeigte das Modell LR mit demselben Anstieg (1,06), ein höheres R^2 (0,9750 zu 0,9594) und eine geringerer Fehlersumme (5,15 zu 8,6). Die Berechnung ausschließlich auf Basis von RF ergab nicht nur den niedrigsten R^2 -Wert, sondern auch die höchsten Fehlersummen.

Schließlich wurde die Berechnung der Biomasse-Konzentration über SSC und der PHB-Konzentration über RF und SSC mithilfe des Farbstoffs LG2 durch das LR-Modell erfolgreich durchgeführt (**Abb. 20**). Die LR-Methode erzielte präzise Ergebnisse für die PHB-Konzentrationen und spiegelte die Referenzwerte für alle drei Kontrollkulturen mit LG2 optimal wider.

Tab. 17: Vergleich der Modellgenauigkeit der genutzten Methoden zur Polyhydroxybutyrat-Berechnung in Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes (vgl. **Abb. 19**). RF: Fluoreszenz, HM: Harmonisches Mittel aus RF und Seitwärtsstreulicht (SSC), S_PR: Quadratwurzel des Produktes aus RF und SSC und LR: Modell Lineare Regression mit den Eingangsdaten aus RF und SSC. R^2 : Bestimmtheitsmaß.

	Kriterium	RF	HM	S_PR	LR
BODIPY ^{493/503}	R^2	0,9236	0,9669	0,9844	0,9745
	Anstieg	1,30	1,19	0,86	1,19
	Fehlersumme	13,19	1,78	7,22	7,90
LipidGreen2	R^2	0,9101	0,9897	0,9855	0,9877
	Anstieg	1,16	1,18	1,42	0,99
	Fehlersumme	10,79	1,23	2,36	1,37
Nile red	R^2	0,9281	0,9573	0,9594	0,975
	Anstieg	0,65	1,47	1,06	1,06
	Fehlersumme	6,01	17,56	8,60	5,15

Höhere Abweichungen zu den Biomasse-Referenzwerten lagen bei der NaCl-Kultur vor, während für die P_i-Mangel und N-Mangel-Kulturen die Modellwerte besser waren. Trotzdem wurden sowohl für die Zielgrößen PHB als auch Biomasse keine signifikanten Unterschiede zu den Referenzwerten festgestellt (**Tab. 18**). Dabei wurden die besten t-Test-Ergebnisse für die Zielgrößen Biomasse und PHB bei der N-Mangel-Kultur ($T_{\text{PHB}(8)} = -0,033$, $p = 0,9747$; $T_{\text{Biomasse}(8)} = 0,041$, $p = 0,9680$) gefolgt von der NaCl-gestressten Kultur ($T_{\text{PHB}(6)} = -0,024$, $p = 0,9814$; $T_{\text{Biomasse}(6)} = 0,150$, $p = 0,8856$) ermittelt.

LR lieferte eine präzisere Wiedergabe der Messdaten im Vergleich zu den Verrechnungen von RF und SCC mittels HM oder S_PR. Aus diesem Grund wurde LR im Fortlauf der Arbeit bei der fluoreszenzspektroskopischen SL-Bestimmung mit LG2 in Mikroalgen (**Kapitel 4.4**) eingesetzt.

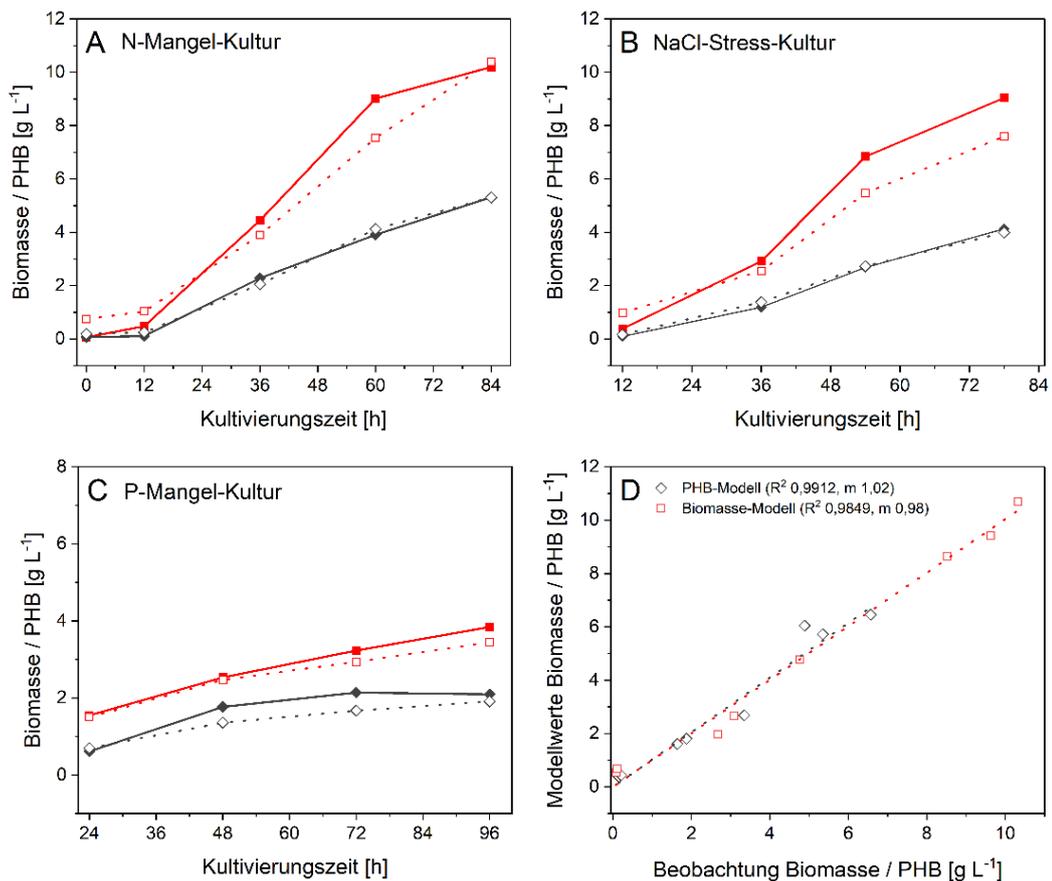


Abb. 20: Modellierung der Biomassebildung und der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Konzentration mit LipidGreen2 der N-Mangel (A), NaCl-Stress (B), und P_i-Mangel (C) *Cupriavidus necator* Kulturen. Modell: Lineare Regression (gestrichelt) im Vergleich zu den analytischen Referenzwerten (durchgehende Linie). Rot: Biomasse, Schwarz: PHB-Konzentration. Auftragung der Modellwerte gegen Beobachtung der Kalibrierungskultur (D). Angabe der Modellgüte in der Abbildung, Berechnet mit OriginPro.

Tab. 18: t-Test-Statistik der Modellwerte gegen die analytischen Referenzdaten (vgl. **Abb. 20**). Modell: Lineare Regression mit dem Farbstoff LipidGreen2. Df: Anzahl der Freiheitsgrade, t-Wert: Größe der Differenz relativ zur Streuung, p-Wert: Evidenzmaß für die Glaubwürdigkeit der Nullhypothese.

Kultur	Bezugsgröße	Df	t	p-Wert
N-Mangel	Biomasse	8	0,041	0,9680
	PHB	8	-0,033	0,9747
P _i -Mangel	Biomasse	6	-0,061	0,9533
	PHB	6	0,552	0,6007
NaCl-Stress	Biomasse	6	0,150	0,8856
	PHB	6	-0,024	0,9814

4.3 Untersuchung der Polyhydroxybutyrat-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 stabil kultivierbar und gegenüber Temperaturschwankungen unempfindlich ist. Darüber hinaus ist diese Spezies aufgrund der Tatsache, dass es keine spezialisierten Zellen bildet, ein geeigneter Kandidat für die Untersuchung der PHB-Bildung in filamentösen Cyanobakterien. Um Kultivierungsstrategien zur Steigerung der PHB-Bildung zu analysieren (**H2**), wurden zunächst geeignete Kultivierungsbedingungen durch eine Metadatenanalyse evaluiert (**Kapitel 4.3.2**). Anschließend wurden biotische und abiotische Faktoren kombinatorisch zur Steigerung der PHB-Bildung eingesetzt (**Kapitel 4.3.3**). Zusätzlich wurden die Auswirkungen verschiedener Mangelbedingungen auf die Biomassezusammensetzung bei mixotropher Kultivierung geprüft (**Kapitel 4.3.4**). Die PHB-Bildung wurde zusätzlich auf genetischer (**Kapitel 4.3.1**) und Produktebene (**Kapitel 4.3.5**) untersucht.

4.3.1 Molekularer Nachweis des PhaC^{III}-Genabschnittes

Zum Nachweis des Vorhandenseins des für die PHB-Bildung notwendigen Schlüsselenzyms (PhaC^{III}) wurde der entsprechende Genabschnitt mit PCR durch publizierte Primer amplifiziert. Um multiple Banden / Nebenbanden durch nicht spezifisches Binden der Primer zu verringern, wurde auf die Touchdown-PCR zurückgegriffen. Als Referenz wurden mehrere DNA-Isolate aus Cyanobakterien und eukaryotischer Mikroalgen, sowie bakterielle Negativkontrollen eingesetzt. Die bakteriellen Isolate, worunter sich mit *C. necator* und *Pseudomonas* sp. sowohl ein Vertreter des Typs PhaC^I sowie PhaC^{II} befand, zeigten keine Bande im erwartenden Fragment-Bereich (**Abb. 21 C**).

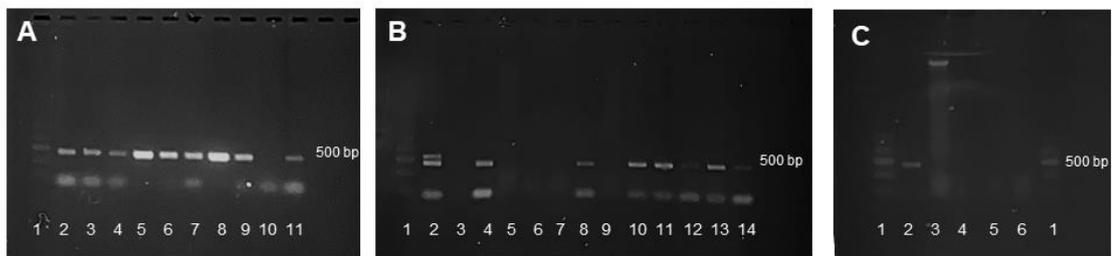


Abb. 21: Agarosegel-Elektrophorese untersuchter Mikroalgenisolate. **A:** 1: DNA-low-range-Ladder, 2: *Synechocystis* sp. PCC6803, 3: *Halomikronema* sp., 4: *Arthrospira platensis*, 5: *Oscillatoriales* Cyanobakterium C1, 6: *Synechococcales* Cyanobakterium C10, 7: *Leptolyngbya* sp. NIVA CYA255, 8: *Nostocales* Isolat I007, 9: *Synechococcales* Isolat C2, 10: *Escherichia coli* DH5 α , 11: NTC. **B:** 1: DNA-low-range-Ladder, 2: *Galdieria sulphuraria*, 3: *Chlorella vulgaris*, 4: *Porphyridium purpureum*, 5: *Chlorophyta* Isolat BA1, 6: *Chlorophyta* Isolat BA2A, 7: *Chlorophyta* Isolat BA2B, 8: *Nostocales* Isolat Rogätz II/2, 9: *Nostocales* Isolat MAL2-1, 10: *Nostoc muscorum*, 11: *Oscillatoriales* Cyanobakterium PS2-KN9, 12: *Nostocales* Isolat I001, 13: NTC, 14: *Escherichia coli* DH5 α . **C:** 1: DNA-low-range-Ladder, 2: *Synechocystis* sp. PCC6803 [PhaC^{III}, Positiv-Kontrolle], 3: *Pseudomonas putida* [PhaC^{II}], 4: *Cupriavidus necator* DSM545, [PhaC^I], 5: *Escherichia coli* DH5 α , 6: NTC. NTC: no template control.

Die als Positivkontrollen eingesetzten Organismen *Synechocystis* sp. PCC6803 (Ordnung: *Synechococcales*), *Arthrospira platensis* (Ordnung: *Oscillatoriales*) und *Nostoc muscorum* (Ordnung: *Nostocales*) zeigten eine deutliche Bande mit einer Fragmentlänge von ca. 485 bp (**Abb. 21 A**). *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA255, zeigt ebenfalls ein positives PCR-Ergebnis (**Abb. 21 A, Lane 7**). Das PhaC^{III}-Amplikon war in allen cyanobakteriellen Isolaten amplifizierbar mit vergleichbarer Fragmentlänge. Zudem ließ sich die Spezifität der für PhaC^{III} ausgewählten Primer durch das Fehlen der Amplikons in den Negativkontrollen bestätigen (**Abb. 21 C**).

Interessanterweise zeigten beide getesteten Rotalgen *Porphyridium purpureum* und *Galdieria sulphuraria* das Vorhandensein des PhaC^{III}-Genes (**Abb. 21 B**). Eine Übersicht aller PCR-Ergebnisse ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 19: Nachweis des PhaC^{III}-Genabschnittes (*phaC*^{III}) in Mikroalgenisolaten. Stammsammlungen: KASC: Köthener Algenstammsammlung, NIVA: norwegische Algenstammsammlung, PCC: Pasteur Stammsammlung der Cyanobakterien Paris, SAG: Algenstammsammlung der Universität Göttingen.

Phylum	Isolat	Herkunft	<i>phaC</i> ^{III}
Chlorophyta	<i>Chlorella vulgaris</i>	SAG 211-11b, KASC04-08	
	Chlorophyta Isolat BA1	Eigenisolat	
	Chlorophyta Isolat BA2A	Eigenisolat	
	Chlorophyta Isolat BA2B	Eigenisolat	
Cyanophyta	<i>Arthrospira platensis</i>	Eigenisolat	x
	<i>Halomikronema</i> sp. C5	Eigenisolat	x
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	NIVA-CYA 255, KASC17-02	x
	Nostocales Isolat MAL2-1	Eigenisolat	
	Nostocales Isolat Rogätz II/2	Eigenisolat	x
	Nostocales Isolat I001	Eigenisolat KASC_I001	
	<i>Nostoc muscorum</i>	SAG 1453-12b, KASC21-02	x
	Oscillatoriales Cyanobakterium C1	Eigenisolat	x
	Oscillatoriales Cyanobakt. PS2-KN9	Eigenisolat	x
	Synechococcales Cyanobakt. C2	Eigenisolat	x
	Synechococcales Cyanobakt. C10	Eigenisolat	x
	<i>Synechocystis</i> sp.	PCC6803, KASC53-01	x
Rhodophyta	<i>Galdieria sulphuraria</i>	SAG 108.79, KASC47-011	x
	<i>Porphyridium purpureum</i>	SSAG 1380-1a, KASC23-01	x

4.3.2 Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien durch Metadatenanalyse

Eine Analyse von 162 veröffentlichten Studien (**Tab. A 4**) wurde durchgeführt, um geeignete Kultivierungsbedingungen für die Induktion von PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 zu identifizieren (**Abb. A 4**). Die Ergebnisse zeigten, dass die PHB-Synthese in 24 verschiedenen Cyanobakterien-Organismen untersucht wurde, die in vier Ordnungen eingeteilt werden konnten. Bei Organismen der Ordnung Nostocales und Synechococcales wurden die höchsten PHB-Gehalte erzielt (**Abb. 22, A, Tab. 20**). Ebenso wurde in den Ordnungen Oscillatoriales und Chroococcales vergleichbare PHB-Mittelwerte von 7,9 % bzw. 8,8 % identifiziert. Dabei fanden die meisten Untersuchungen in der Ordnung Oscillatoriales mit dem Organismus *Arthrospira* sp. statt. Der Median von Nostocales (13,5 %), war geringer als der Mittelwert (20,6 %), wobei der am häufigsten dokumentierte PHB-Gehalt (Modus) 22 % betrug. Der Median von Synechococcales lag in derselben Größenordnung wie bei Nostocales (11,4 %). Allerdings weichte der Modus (9,5 %) stark von Nostocales ab. Dabei wurde ein durchschnittlicher PHB-Gehalt von 16,8 % erzielt.

Tab. 20: Auswertung der Studien zur Polyhydroxybutyrat-Bildung in Cyanobakterien durch deskriptive Statistik. Angegeben ist %-PHB-Anteil von der Biomasse. Ergebnisse basieren auf **Tab. A 4**.

	Nostocales	Oscillatoriales	Chroococcales	Synechococcales
Studienanzahl	51	29	25	57
PHB(Mittelwert)	20,6	7,9	8,8	16,8
PHB(Median) [%]	13,5	3,5	5,8	11,4
PHB(Modus) [%]	22	6	0	10
PHB(Min) [%]	0	0	0	0,8
PHB(Max) [%]	85	44	36	81

Zur Induktion der PHB-Bildung wurden phototrophe, mixotrophe und heterotrophe Kultivierungsstrategien angewandt, wobei die höchste PHB-Bildung bei heterotropher Prozessführung (Median: 22 %), vor Mixotrophie (Median: 17 %) vor Phototrophie (Median: 3 %) analysiert wurde (**Abb. 22 B**). Dabei lag eine ungleichmäßige Verteilung der Studien vor.

Heterotrophie wurde in 14 Studien untersucht, Mixotrophie in 51 und Phototrophie in 96. Bei phototropher Kultivierung wurden die im Durchschnitt geringsten PHB-Gehalte erzielt.

Als verwendete Substratquelle für mixotrophe oder heterotrophe Prozessführung überrag Acetat (Anzahl: 35) vor Glucose (Anzahl: 5) oder Fructose (Anzahl: 5). Als Mangelbedingungen wurde N-Mangel, P_i -Mangel und NP_i -Mangel untersucht (**Abb. 22 C**). Der Großteil der Studien erfolgte allerdings bei ausbalancierten (ohne Mangel) Bedingungen. N-Mangel erwies sich als häufigste eingesetzte PHB-Induktionsstrategie.

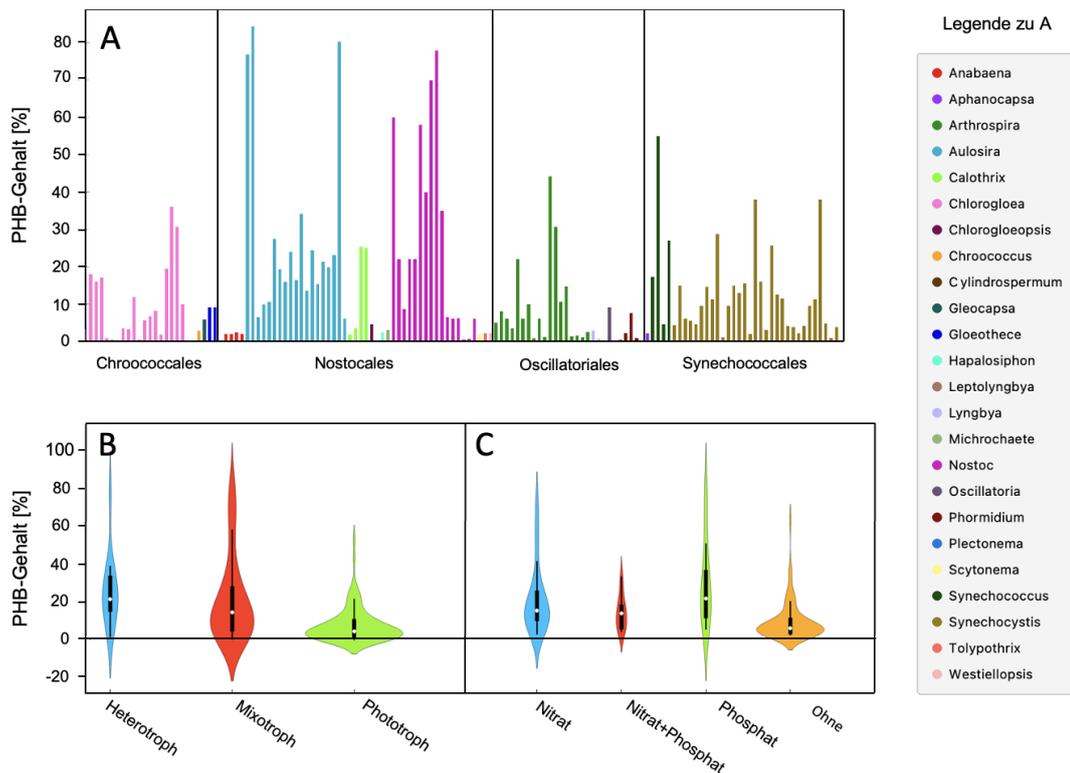


Abb. 22: Auswertung der Metadatenanalyse zur Identifizierung geeigneter Kultivierungsstrategien für *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Auftragung maximal erzielter Polyhydroxybutyrat-Gehalte in Abhängigkeit der Ordnungen (A), Auftragung in Abhängigkeit der Kultivierungsstrategie (B) und eingesetzte Mangelbedingungen (C) Datensatz basierend auf **Tab. A 4**. Erstellt mit Orange.

Dabei unterschied sich der gebildete maximale PHB-Gehalt (Median: 17 %, max. 78 %) nicht wesentlich zu NP_i -Mangel (Median: 16,5 %, max. 81 %). Unter P_i -Mangel wurden hingegen die höchsten PHB-Gehalte beschrieben (Median: 24 % max. 84 %). Im Vergleich dazu wurden ohne Mangelbedingung nur sehr geringe PHB-Gehalte erzielt (Median: 3 %).

Die Erkenntnisse spiegelten sich auch für die Ordnung Synechococcales wider. Eine Entscheidungsbaumanalyse ergab, dass die Konstellation der Parameter Mixotrophie (Substratquelle: Acetat), Mangel (N, P oder NP) die höchsten PHB-Gehalte von 55 % - 81 % ergaben (**Abb. A 9**).

4.3.3 Analyse abiotischer und biotischer Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung

Zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf die PHB-Bildung wurde DoE eingesetzt. Der Einfluss einer Gasaustauschlimitation (GEL) resultierte in der grünen Kultur zu einem Abbau der Photosynthese-assoziierten Pigmente, welches an der Entfärbung der Kultur erkennbar war (**Abb. 23 A**). Bei den belichteten Kulturen transformierte sich der Chlorose-bedingte dormante (gelbe) Zustand, wenn Nitrat supplementiert wurde. Der kulturbedingte Farbumschlag (gelb zu grün) war besonders sichtbar bei Platte A: Well A2 und C2.

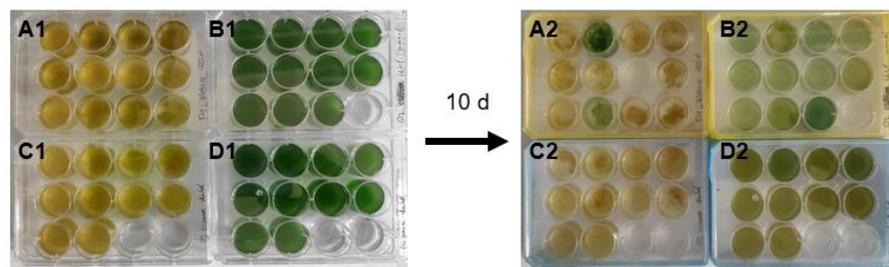


Abb. 23: Fotografische Aufnahmen des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Einflussgrößen auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. **A:** Nitrat-Mangel vorgestresste Kultur, kultiviert unter Belichtung und Schütteln, **B:** Nicht-vorgestresste Kultur, kultiviert unter Belichtung und Schütteln, **C:** Nitrat-Mangel vorgestresste Kultur, kultiviert unter Licht- und Begasungsaustauschlimitation, **D:** Nicht-vorgestresste Kultur, kultiviert unter Licht- und Begasungsaustauschlimitation. 1: Zustand zu Beginn des Experimentes, 2: Zustand zum Ende des Experimentes nach 10 d Kultivierung. Wellnomenklatur je Platte: horizontal von links nach rechts: 1-4, vertikal von oben nach unten: A, B, C.

Dabei zeigten die physiologischen Zustände und die Kultivierungsbedingung neben der Kultivierungszeit den größten Einfluss auf das PHB-Bildungsmodell. Die Variable „Limitation“ wies den höchsten positiven Effekt auf die PHB-Bildung auf, gefolgt von Carbonat und der Kultivierungszeit (**Abb. 24 A**).

Die Erhöhung der Konzentration von NaCl und den Spurenelementen zeigt ebenfalls einen positiven Effekt auf die PHB-Bildung. GEL, Nitrat und Glucose wiesen die größten negativen Einflüsse auf die Zielgröße auf. Die oxidativen Stressoren Ethanol und H₂O₂ zeigten keinen positiven Effekt. Der Einfluss der Substrate Acetat und Fructose war vergleichbar zueinander, spielten aber im Modell eine untergeordnete Rolle. Das Modell wies eine hohe Güte (R^2 0,93, W^2 0,98, Df 98) auf. Dieses spiegelte auch die Auftragung analytischen Referenzwerte Werte gegen die Modelldaten wider (R^2 0,9620) (**Abb. 24 B**). Die Residualverteilung bestätigte die Normalverteilung der Ergebnisse (**Abb. 24 C**).

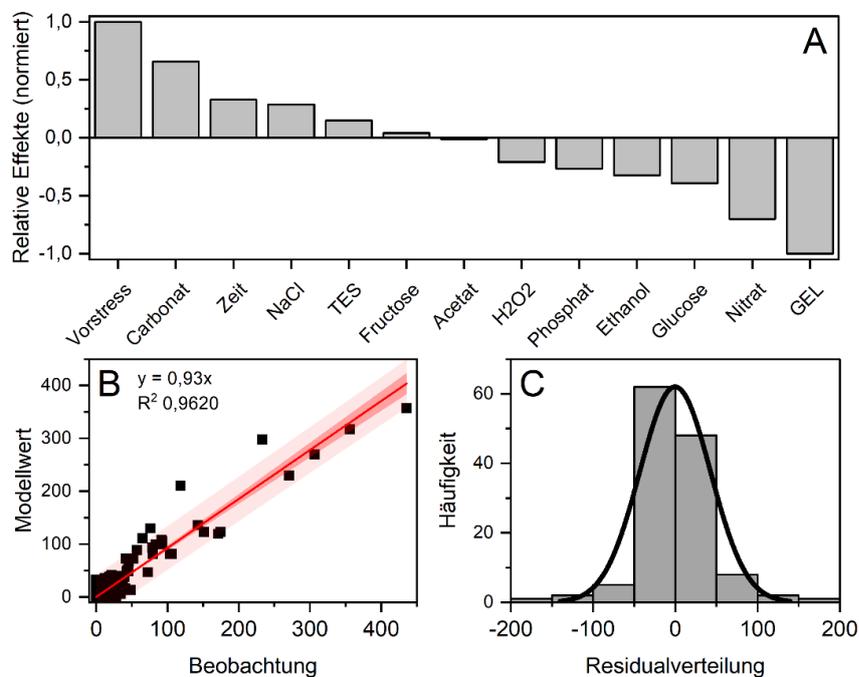


Abb. 24: Modellergebnisse der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Normierte relative Effekte auf die PHB-Bildung (**A**), Auftragung Modellwerte gegen Beobachtung (**B**) und Histogramm der Residualverteilung (**C**). Abkürzungen: NaCl: Natriumchlorid, TES: Spurenelementlösung, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, GEL: Gasaustauschlimitation.

Um das Verständnis der Rangfolge der Einflussgrößen auf die PHB-Bildung zu analysieren, wurde eine Entscheidungsbaum-Analyse mit fünf Entscheidungsstufen durchgeführt (**Abb. 25**).

Die Art der Kultur (Kulturstatus) ergab sich als erste Entscheidungsstufe im Modell. Von den vier untersuchten Kulturen/Kulturzuständen führte nur die vorgestresste begaste Kultur zu hohen PHB-Gehalten (**Abb. A 5**). Die zweite Entscheidungsstufe war die N-Konzentration.

Bei fortführenden N-Mangel (Stufe 2), einer Zugabe von NaCl (Stufe 3) und einer Kultivierungszeit von mehr als 4 d (Stufe 4) wurde der höchste PHB-Gehalt erzielt.

P_i-Mangel in Kombination mit N-Mangel führte ebenfalls zu einer Erhöhung der PHB-Konzentration. Allerdings wurden dabei niedrigere maximale Konzentrationen (max. 121,8 µg mL⁻¹) erreicht. Carbonat, welches bei der Analyse der relativen Effekte (**Abb. 24**) den zweitgrößten positiven Effekt aufwies, wurde bei der Entscheidungsbaumanalyse unter den fünf wichtigsten Stufen nicht berücksichtigt.

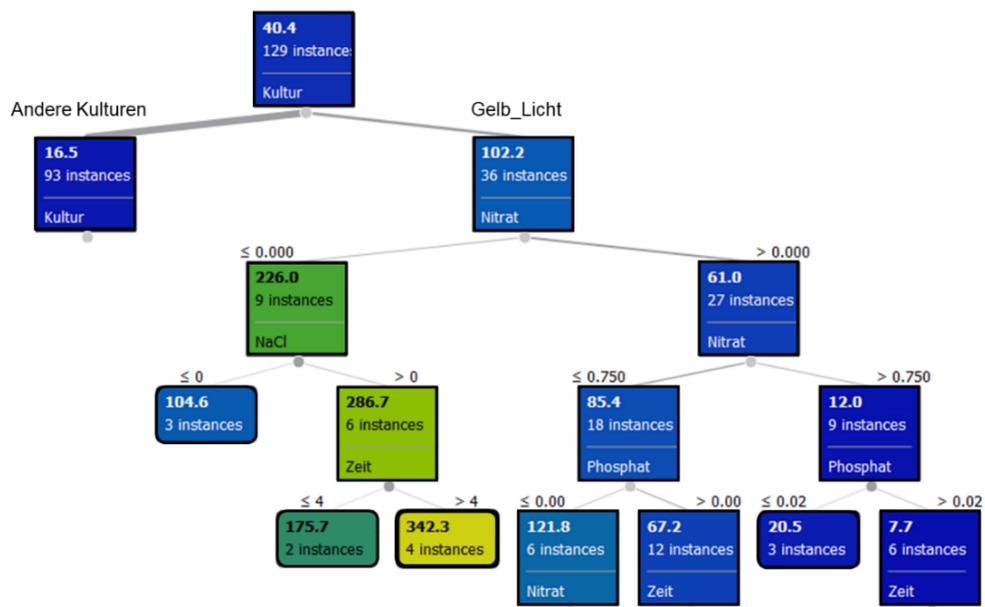


Abb. 25: Entscheidungsbaum zur Evaluierung der Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat (PHB)-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Durchschnittliche PHB-Konzentration sind als Zahlenwerte angegeben und mit falsch-farben Markierung der Kästchen differenziert. Zweigdicke: Visuelle Darstellung der Anzahl der Ereignisse (Instances) bezogen auf die Gesamtanzahl (129). Erstellt mit Orange.

4.3.4 Untersuchung der Effekte von Mangelzuständen auf die Biomassezusammensetzung bei mixotropher Kultivierung

Aus dem statistischen Versuchsplan ging hervor, dass für eine erhöhte PHB-Bildung ein Limitation (Vorstress) notwendig ist. Als Limitation wurde im Versuchsplan N-Mangel untersucht. Auf Grundlage der Erkenntnisse wurden daher neben N-Mangel auch P_i - und NP_i -limitierte vorgestresste Kulturen erzeugt und anschließend unter Acetat-Zugabe (Mixotrophie) die Speicherlipidbildung forciert. Die nicht-bemangelte Kontrollkultur zeigte dabei längere blaugüne Filamente mit runden apikalen Zellen (**Abb. 26 A-D**). N-Mangel führte zu Chlorose, die durch Farbänderung der Kultur und Zellen gekennzeichnet war. Die Zell- und Filamentstruktur blieb davon unbeeinflusst. Morphologische Änderungen traten bei P_i -Mangel auf.

Dabei zeigten sowohl P_i -Mangel als auch NP_i -Mangel sehr kurze Filamente. Die höchste Biomasse-Konzentration von $1,48 \text{ g L}^{-1}$ und die höchste Wachstumsrate ($64,4 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) wurde in der Kontrollkultur erreicht (**Abb. 26 E-H**). Die Defizitbedingungen führten zu einer geringeren Produktivität. *Leptolyngbya* sp. reagierte auf P_i -Mangel mit geringen Wachstumsraten von $6,9 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (P_i -Mangel) bzw. $9,4 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (NP_i -Mangel). N-Mangel verzeichnete einen geringeren Einfluss auf die Biomasse-Produktivität als P_i -Mangel. Zwar zeigte die N-Mangel-Kultur ein 44 % niedrigeres Wachstum als die Kontrollkultur auf, wiederum war dieses mit $36,3 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ und einer finalen Biomassekonzentration von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ jedoch höher als unter P_i - und NP_i -Mangel. Die Supplementierung mit Acetat, leitetet die mixotrophe Produktbildungsphase ein und führte zu einem Rückgang der Biomassebildung in allen Kulturen. Die Reduzierung war unter P_i - und NP_i -Mangel gering, da das Wachstum schon in der vorherigen phototrophen Mangel-Phase stagnierte. Den größten Rückgang verzeichnete die Kontrollkultur, die während der mixotrophen Kultivierungsphase 48 % der Biomasse einbüßte und in einer finalen Biomassekonzentration von $0,85 \text{ g L}^{-1}$ resultierte.

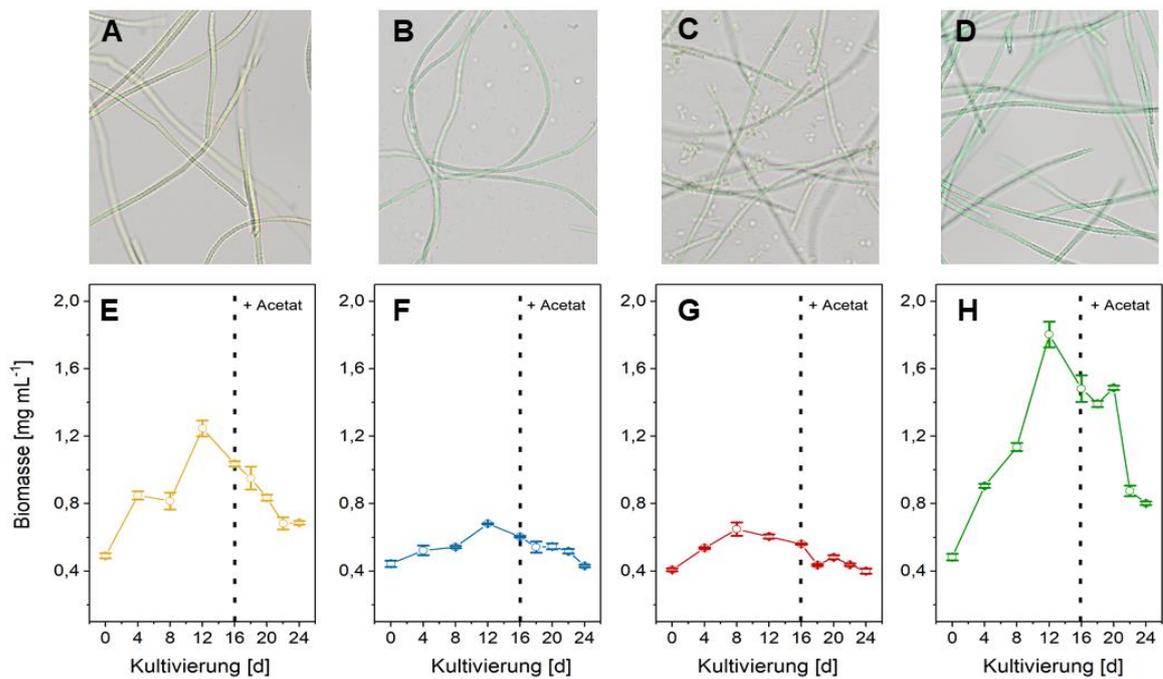


Abb. 26: Biomassebildung von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**E-H**) und mikroskopische Aufnahmen (**A-D**) kultiviert unter N-Mangel (**A, E**), P_i -Mangel (**B, F**) und NP_i -Mangel (**C, G**), verglichen zur nicht-bemangelten Kontrollkultur (**D, H**). Die vertikale gestrichelte Linie kennzeichnet den Beginn der mixotrophen Phase, supplementiert mit Acetat. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen dar.

Unter N-Mangel verzeichnete die Kultur einen Rückgang um 42 %, welcher in der gleichen Größenordnung wie bei der Kontrollkultur lag. Am Ende der mixotrophen Phase lag somit nur noch eine Biomasse von $0,68 \text{ g L}^{-1}$ vor. Während der Kultivierungsphase in der mixotrophen Stufe wurde die Bildung von PHB und Glykogen analysiert (**Abb. 27**). In dieser Phase konnte bei allen Kulturen eine Abnahme des Glykogens festgestellt werden. Die N-Mangelkultur wies dabei den höchsten initialen intrazellulären Gehalt (212 mg g^{-1}) auf, während unter NP_i -Mangel, P_i -Mangel und in der Kontrollkultur Glykogen-Konzentrationen von 87 mg g^{-1} , 55 mg g^{-1} bzw. 7 mg g^{-1} vorlagen.

Unter N- und NP_i -Mangel lag eine Glykogenmobilisierungsrate während der mixotrophen Phase von ca. $10 \text{ mg g}^{-1}\text{d}^{-1}$ vor. Da die initiale Glykogenkonzentration unter N-Mangel deutlich höher war als unter NP_i -Mangel, wurde bei vergleichbarer Mobilisierungsrate das Glykogen unter N-Mangel bis zum Ende des Experiments nicht vollständig abgebaut. Unter NP_i -Mangel hingegen war der Glykogen-Pool nach 6 d der mixotrophen Phase erschöpft.

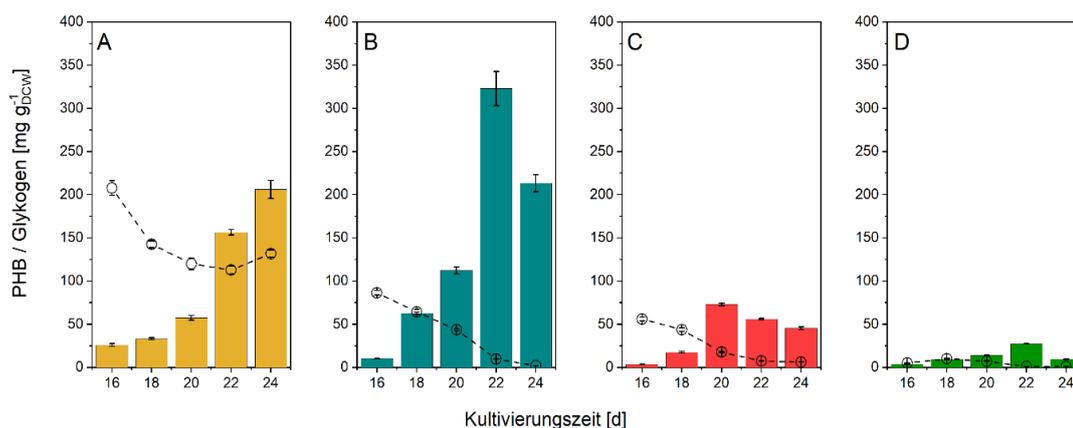


Abb. 27: Polyhydroxybutyrat (PHB)- und Glykogenbildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 in der mixotrophen Mangel-Phase. Kulturen wurden in N-Mangel (A), NP_i-Mangel (B), Pi-Mangel vorgestresst (C). Supplementation: Acetat, 2,0 g L⁻¹ im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Mangel (D). Balken: PHB, Punkt-Strich: Glykogen. Standardabweichung repräsentiert die Messung aus drei Replikationen.

Während der mixotrophen Phase bzw. am Ende der phototrophen Mangel-Phase wurde in allen Kulturen eine PHB-Bildung festgestellt. Allerdings wies nur die N-Mangel-Kultur mit 26 mg g⁻¹ eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den anderen Kulturen auf. Die Konzentrationen unter NP_i-, P_i-Mangel und der Kontrollkultur betragen weniger als 4 mg g⁻¹. Nach der Zugabe von Natriumacetat stieg der PHB-Gehalt in allen Kulturen an.

Die maximale PHB-Konzentration unter P_i-Mangel und in der Kontrollkultur betrug 73 mg g⁻¹ bzw. 27,5 mg g⁻¹ nach 4 bzw. 6 d. Unter NP_i-Mangel wurde von allen Mangel-Kulturen der höchste PHB-Gehalt (325 mg g⁻¹, 6 d) erzielt. Zum letzten Beprobungspunkt fiel die Konzentration auf 213 mg g⁻¹ ab, welches gleichzeitig mit der Erschöpfung des Glykogens einherging. Unter N-Mangel konnte eine kontinuierliche Zunahme der PHB-Konzentration festgestellt werden. Der Anteil erhöhte sich dabei auf 206 mg g⁻¹. Unter Berücksichtigung, dass unter N-Mangel eine höhere Biomasse-Konzentration erzielt wurde, war die absolute PHB-Konzentration unter N-Mangel (141 mg L⁻¹) höher als in der NP_i-Mangel-Kultur (92 mg L⁻¹).

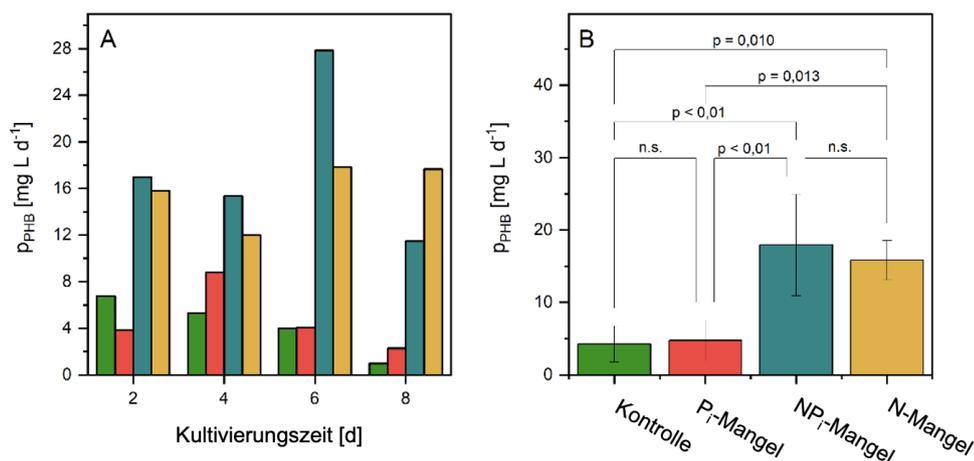


Abb. 28: Vergleich der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Produktivität von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 in der mixotrophen Phase in Abhängigkeit der Mangelbedingungen. **A:** Produktivität über der Zeit, **B:** Paired-Comparison-Plot der gemittelten PHB-Produktivität mit Signifikanz- $(\alpha=0,1)$. n.s.: nicht signifikant. Farben der Balken in A und B entsprechen der Bezeichnung in B.

Bei einem Vergleich der durchschnittlichen Produktivität der Mangel-Kulturen wurde keine bedeutende Differenz in der PHB-Produktivität zwischen N-Mangel ($16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) und NP_i-Mangel ($18 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) festgestellt (**Abb. 28**). Ebenso war kein wesentlicher Unterschied zwischen der Kontrollkultur und der P_i-Mangel-Kultur vorhanden. Allerdings wiesen die Kulturen ohne N-Mangel im Hinblick auf die PHB-Bildung signifikante Abweichungen gegenüber den Kulturen mit N-Limitierung auf. Neben der PHB- und Glykogenbestimmung wurde am letzten Beprobungspunkt zusätzlich die Verteilung der FAME und der Lipidgruppen untersucht, da TAGs als Lipidgruppe und C16- bzw. C18-Fettsäuren typische Marker-Moleküle in Lipidkörpern darstellen [87].

Alle Mangel-Kulturen zeigten im Vergleich zur Kontrollkultur eine Verdoppelung des TAG-Gehalts auf (**Tab. 21**). Dabei wurden Gehalte von $13,6 \text{ mg g}^{-1}$ (N-Mangel), $15,6 \text{ mg g}^{-1}$ (P_i-Mangel), $16,1 \text{ mg g}^{-1}$ (NP_i-Mangel) und $7,2 \text{ mg g}^{-1}$ (Kontrolle) erreicht. Der Gehalt an polaren Lipiden (PL) war in P_i-Mangel mit $7,4 \text{ mg g}^{-1}$ am niedrigsten. In der Kontrollkultur, N-Mangel und NP_i-Mangel konnten Werte von $18,4 \text{ mg g}^{-1}$, $11,4 \text{ mg g}^{-1}$ und $10,3 \text{ mg g}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die Summe der C16 und C18-Fettsäuren erreichte dabei einen Wert von $5,8 \text{ mg g}^{-1}$ in der Kontrollkultur.

Die Mangel-Kulturen wiesen mit 13,2 mg g⁻¹ (N-Mangel), 17,9 mg g⁻¹ (P_i-Mangel) und 13,7 mg g⁻¹ (NP_i-Mangel) eine zur Kontrolle geringfügig erhöhte Konzentration auf. Der Proteingehalt war unter N-Mangel mit Abstand zu den anderen Kulturen am niedrigsten (13,5 %). Dieses resultierte in einem C/N-Verhältnis von 13,0 g g⁻¹. P_i-Mangel (26,1%) und NP_i-Mangel (22,0 %) zeigten höhere Proteingehalte, die ca. der Hälfte der Kontroll-Kultur (44,8 %) entsprachen.

Tab. 21: Konzentrationen und Zusammensetzung der Biomassebestandteile von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 nach 8 d mixotropher Mangelkultivierung. BM: Biomasse, C/N: Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff, Glyk: Glykogen, FAME: Fettsäuremethylester, PHB: Polyhydroxybutyrat, PL.: Polarlipide, Summe von Monogalactosyldiacylglycerol, Phosphatidylglycerol, Sulfoquinovosyldiacylglycerol, Digalactosyldiacylglycerol, Phosphatidsäure und Phosphatidylserin. TAG: Triacylglycerole,

Kategorie	Klasse	Kontrolle	N-Mangel	P _i -Mangel	NP _i -Mangel
Biomasse und Speicherstoffe	BM [mg L ⁻¹]	841,7	687,7	356,5	371,7
	PHB [mg g ⁻¹]	9,6	206,0	4,6	213,3
	Glyk [mg g ⁻¹]	1,0	132,0	0,6	2,0
Lipid-Klassen	TAG [mg g ⁻¹]	7,2	13,6	15,6	16,1
	PL [mg g ⁻¹]	18,4	11,4	7,4	10,3
FAME	C ₁₆ [mg g ⁻¹]	5,8	10,1	9,2	7,3
	C ₁₈ [mg g ⁻¹]	0,0	3,1	8,7	5,4
Elementar-Analyse	Protein [%]	44,8	13,5	26,1	22,0
	C/N [g g ⁻¹]	4,5	13,0	5,5	8,6

4.3.5 Extraktion- und Polymer-Charakterisierung

Zur Bestätigung der PHB-Bildung wurde aus der Biomasse der endstelligen Proben das Polymer mit Chloroform extrahiert und die monomere Zusammensetzung mit GC-MS und die Konformität mit FTIR untersucht. Charakteristischen Wellenzahlen des PHB-Standards wurden im FTIR-Spektrum durch die Carbonylgruppe (C=O) bei 1726 cm^{-1} und die asymmetrische C-O-C-Streckschwingung bei 1279 cm^{-1} detektiert (**Abb. 29**). Die Banden bei 1460 cm^{-1} und 1378 cm^{-1} sind bezeichnet für die $-\text{CH}_2$ bzw. $-\text{CH}_3$ Gruppen im PHB.

Im Fingerabdruckbereich zwischen 1130 cm^{-1} - 979 cm^{-1} traten spezifische C-O und C-C Streckschwingung auf. Mit einer Übereinstimmung von 97,2 % entsprachen die Spektren des isolierten Polyesters aus *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 denen des PHB-Standards.

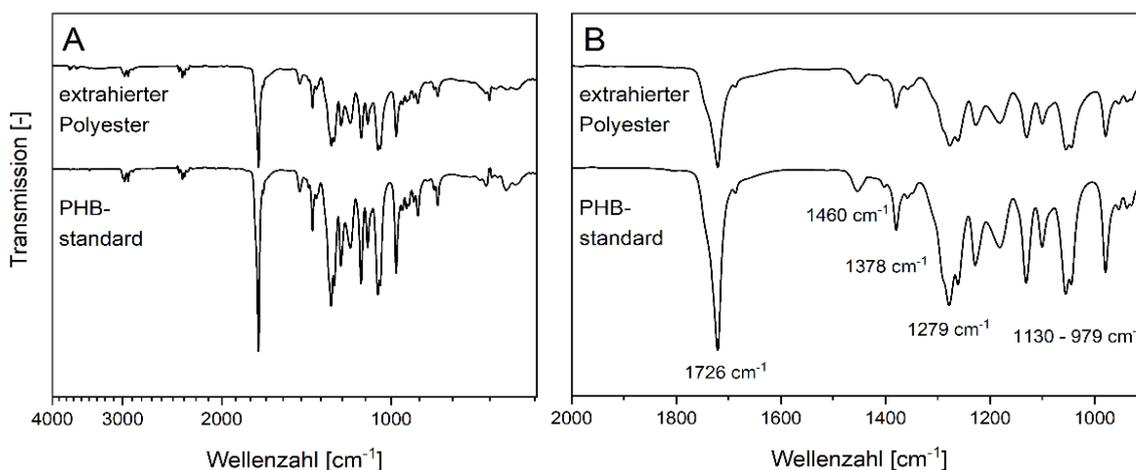


Abb. 29: FTIR-Spektren des extrahierten Polyhydroxybutyrat (PHB) aus *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 und PHB-Standard. **B:** Eingrenzung der Spektren (2000 bis 800 cm^{-1}).

Da vom FTIR-Spektrum schwer zwischen verschiedenen PHA-Vertretern, insbesondere scl-PHAs, unterschieden werden kann, wurde die monomere Zusammensetzung durch GC-MS analysiert (**Abb. 30**). Verglichen zu dem Copolymer PHBHV, der zwei Peaks bei 3,75 min (Butyrat) und bei 4,8 min (Valerat) im Chromatogramm zeigte, konnte im extrahierten Polymer neben dem internen Standard (Benzoesäure, 6,5 min) nur Butyrat detektiert werden. Valerat, welches eine Methyl-Gruppe in der Seitenkette mehr als Butyrat aufweist, war nicht nachweisbar. Durch die Abwesenheit des Peaks konnte die Biosynthese des reinen Homopolymer PHB bestätigt werden.

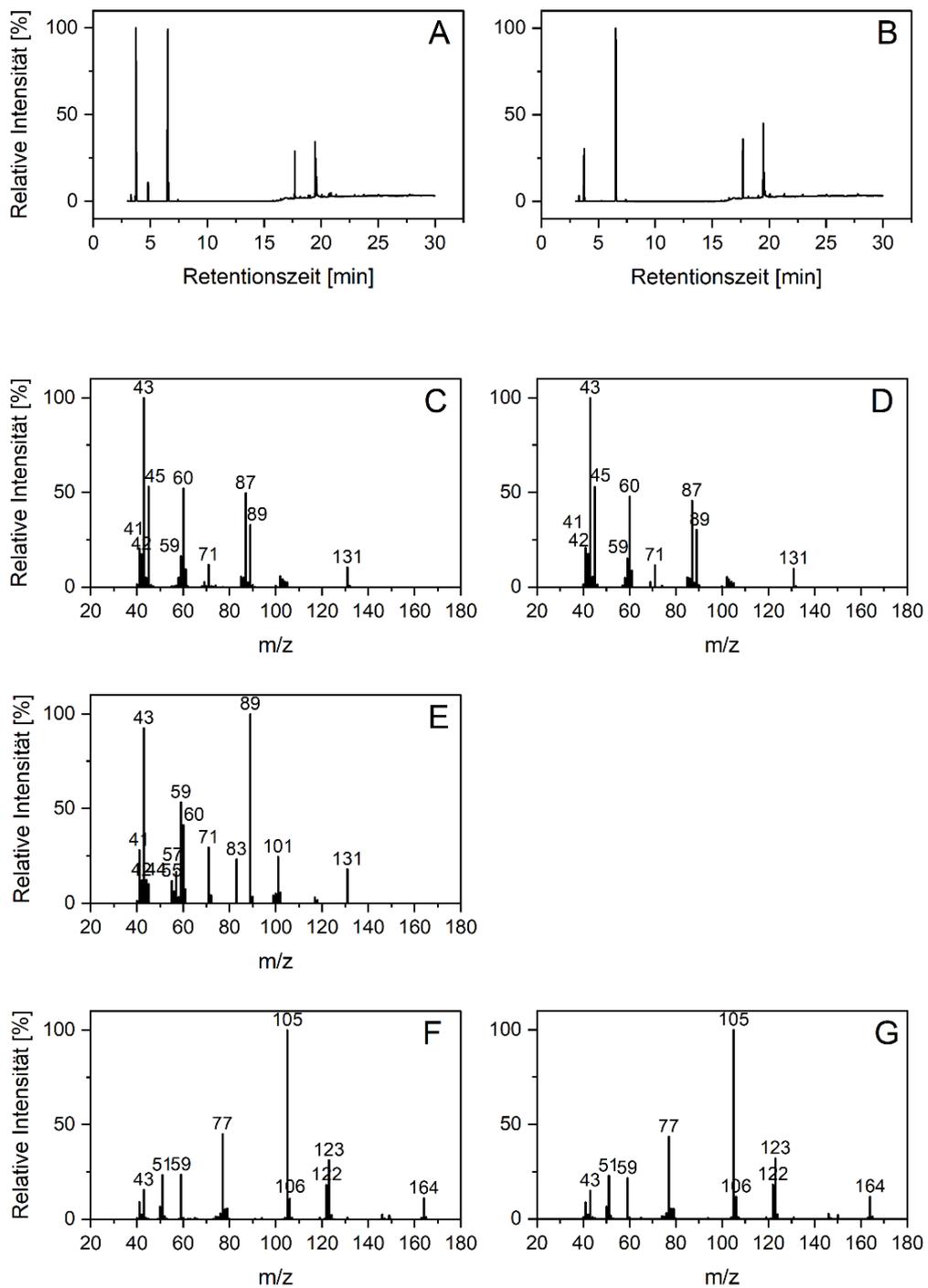


Abb. 30: GC-MS Ergebnisse des Polyhydroxyalkanoat aus *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 [**rechte Reihe**] im Vergleich zum Poly(3-hydroxybutyrats-co-3-hydroxyvalerat)-Standard (PHBV) [**linke Reihe**]. Retentionszeiten (**A, B**): 3,75 min: Butyrat, 4,8 min: Valerat, 6,5 min: Benzoesäure. Massenspektren: Butyrat (**C, D**), Valerat (**E**), Benzoesäure (**F, G**).

4.4 *In situ*-Bestimmung von Speicherlipiden in Mikroalgen mit LipidGreen2

Die mit *C. necator* entwickelte Fluoreszenzmethode (**Kapitel 4.2**) sollte anschließend auf SL-produzierende Mikroalgen angewandt, um eine Beurteilung des Einflusses der phylogenetischen Distanzen und zellmorphologische Unterschiede auf die SL-Bestimmung mit LG2 vornehmen zu können (**H3**).

Für die fluoreszenzspektroskopische PHB-Bestimmung mit LG2 in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.4.1**) wurden die Daten aus der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die PHB-Bildung (**Kapitel 4.3.3**) sowie die Auswirkungen von Mangelbedingungen (**Kapitel 4.3.4**) berücksichtigt.

Für die Bestimmung der Lipid/TAG-Konzentration wurden drei eukaryotische einzellige Mikroalgen aus unterschiedlichen Phyla verwendet. Aus dem Phylum der Rhodophyta (Rotalgen) wurde *Porphyridium purpureum* gewählt. Des Weiteren wurde die marine Mikroalge *Nannochloropsis salina* (Ochrophyta) untersucht, da sie ein vielversprechender Kandidat für die kommerzielle Herstellung von Lipiden ist und bereits in der Aquakultur als Futtermittel Verwendung findet. Als Vertreter der Grünalgen (Chlorophyta) wurde das Eigenisolat *Stichococcus* sp. WB02 ausgewählt, welche eine ähnliche Zellgröße wie *Nannochloropsis* sp. besitzt und ebenfalls ein geeigneter Repräsentant für eine technische Lipid-Produktion darstellt [98].

Zur Analyse der Lipid/TAG-Bildung wurde zunächst ein Biomasse-, Lipid- und TAG-Profil erstellt (**Kapitel 4.4.2**). Diese Daten dienen als Grundlage für die Modellierung mit der LG2-Fluoreszenz (**Kapitel 4.4.3**).

4.4.1 Polyhydroxybutyrat-Bestimmung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 durch LipidGreen2-Fluoreszenz

Die PHB-Bestimmung mittels der an *C. necator* erstellten Fluoreszenzmethode mit LG2 erfolgte sowohl bei dem Screening zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf die PHB-Bildung (**Kapitel 4.3.3**), als auch bei der Untersuchung der Effekte der Mangelbedingungen auf die Biomassezusammensetzung bei mixotropher Kultivierung (**Kapitel 4.3.4**). Beim Screening wurde zusätzlich die Phycocyanin- Fluoreszenz (PC) aufgezeichnet. PC, als Photosynthese-assoziiertes Pigment, diente dabei als Maß für den photosynthetisch-aktiven Zustand der Zellen. Dabei wurde PC hauptsächlich in den grünen Kulturen am Ende der Experimentalreihe detektiert. PC stand in einem indirekt-proportionalen Verhältnis zur PHB-Bildung. In den Kulturen mit hoher PC-Fluoreszenz konnten demnach nur geringe PHB-Konzentrationen detektiert werden (**Abb. 31 A**). Dabei zeigte die gelbe belichtete Kultur eine geringe Ausprägung der PC-Fluoreszenz.

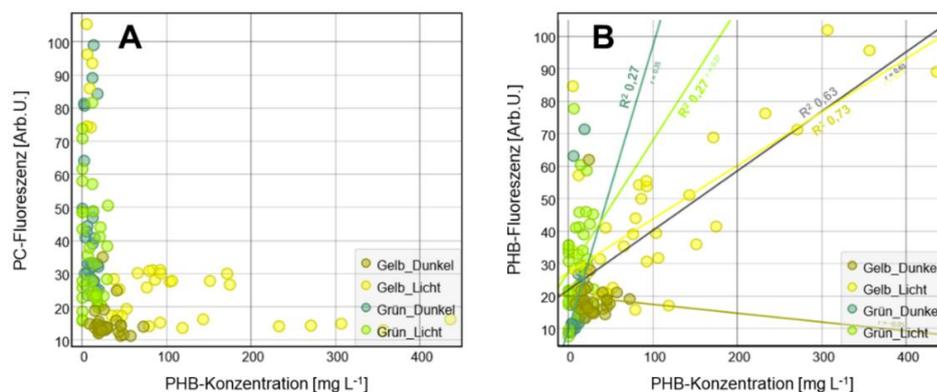


Abb. 31: Zusammenhang der Phycocyanin (PC) -Fluoreszenz zur Polyhydroxybutyrat (PHB)-Konzentration (**A**) und der LipidGreen2-Fluoreszenz zur PHB-Konzentration (**B**). Auftragung nach unterschiedlichen Kulturzuständen (siehe Legende in der Abbildung) und Vereinigung aller Daten der Kulturzustände (grau).

Mit Zunahme der PHB-Konzentration war eine Abnahme der PC-Fluoreszenz feststellbar. Unter Berücksichtigung aller Wells ergab sich ein Korrelationskoeffizient der LG2-Fluoreszenz den analytischen PHB-Referent von 0,63 (**Abb. 31 B**). Aufgrund der stark variierenden Zusammensetzung der Wells, konnte die LG2-Fluoreszenz schwer mit der PHB-Konzentration in einen Zusammenhang gebracht werden. Die Auswertung der Daten, aufgeteilt nach den unterschiedlichen Kulturzuständen ergab ein differenziertes Muster. Insbesondere die gelb belichtete Kultur wies eine höhere Varianz der PHB-Daten auf als die anderen Kulturen.

Der Korrelationskoeffizient betrug hierbei 0,73. In den restlichen Kulturen, in denen die analytischen Messungen eine deutlich geringere PHB-Bildung ergaben, sank der Korrelationskoeffizient auf 0,27 für die Daten der grünen belichteten und unbelichteten Kultur. Keine Korrelation (R -0,05) konnte für die gelbe unbelichtete Kultur festgestellt werden.

Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Analyse der Auswirkungen der Mangelbedingungen auf die PHB-Bildung (**Kapitel 4.3.4**) die LG2-Fluoreszenz aufgezeichnet. Dabei wurde zunächst geprüft, ob die Regressionsmodelle, die für *C. necator* entwickelt wurden (**Kapitel 4.2.2**), auch für die Bestimmung von PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 anwendbar waren. Es stellte sich jedoch heraus, dass dies nicht der Fall war, da die resultierenden Daten nicht mit den Referenzmessungen durch HPLC übereinstimmten. Aus diesem Grund wurden für die Daten der *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 Kulturen eigene Modelle, nach derselben Herangehensweise wie bei *C. necator* erstellt. Bei den geprüften Regressionsmodellen (LR, KNN, SVM) stellte sich LR als effektives Modell für die Bestimmung der PHB-Konzentration unter Einsatz des SSC und der RF für beide analysierten Kulturen heraus. Dabei ergaben sich höhere Korrelationskoeffizienten, wenn die Fluoreszenzintensität anstelle der Fläche des Emissionssignal als Datengrundlage verwendet wurden (**Tab. 22**). Dabei wurde wiederum die höchste Korrelation erzielt, wenn die Daten des vereinigten Datensatzes aus beiden Kultivierungen für die Modellerstellung berücksichtigt wurden (R 0,9879). Die Regressionen in Abhängigkeit des Kulturzustands (N-Mangel, NP_i-Mangel) erzielten mit 0,9755 (N-Mangel) bzw. 0,9812 (NP_i-Mangel) geringfügig niedrigere Korrelationskoeffizienten.

Tab. 22: Modellergebnisse der Polyhydroxybutyrat-Bestimmung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 durch LipidGreen2-Fluoreszenz. Modelle: LR: Lineare Regression, KNN: künstliches neuronales Netz, SVM: Support Vector Machines, FL: Fluoreszenz. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient.

Kultur	Zielgröße	FL-Signal	LR	KNN	SVM
Alle	Biomasse	Intensität	0,2300	-0,1620	-0,3980
		Fläche	-0,1330	-0,6950	-0,1150
	PHB	Intensität	0,9879	-1,6480	-0,1520
		Fläche	0,8380	-1,7220	-0,1660
N-Mangel	PHB	Intensität	0,9755	-2,1490	-1,0020
		Fläche	0,8190	-2,2030	-1,0000
NP _i -Mangel	PHB	Intensität	0,9812	-0,8550	-0,8980
		Fläche	0,8350	-0,9190	-0,9000

Durch die Auftragung der Modell- gegen die Referenzwerte konnte mit einem Geradenanstieg von 1,02 die hohe Modellgüte bestätigt werden (**Abb. 32 A**). Dabei wurde festgestellt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den PHB-Konzentrationen der Referenzmessungen und der mit dem LG2-LR-Modell ermittelten auftraten ($t(18) = -0,41, p = 0,6842$). Für die Bestimmung der Biomasse mittels SSC konnte kein Modell mit hoher Korrelation identifiziert werden. Dabei lag dieses unabhängig von der verwendeten Kultur oder dem Fluoreszenzsignal vor.

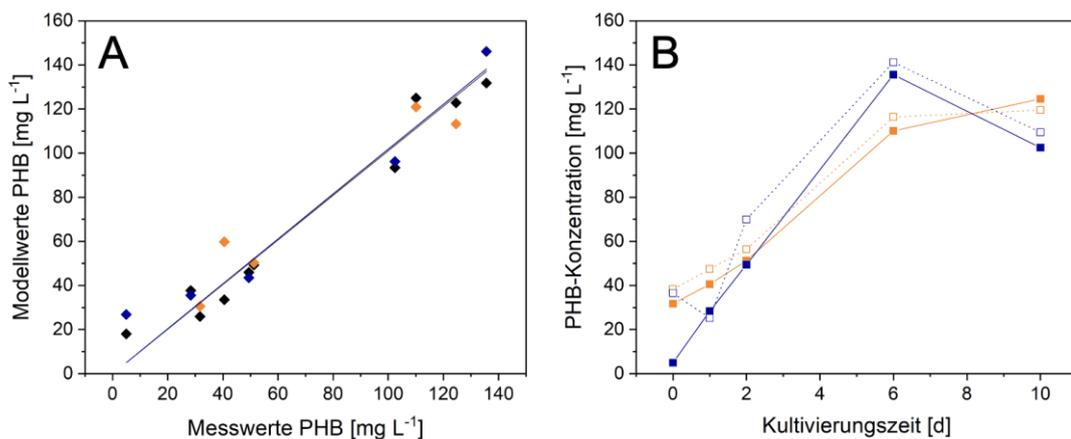


Abb. 32: Modellierung der Polyhydroxybutyrat (PHB)-Konzentrationen in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 durch das Modell Lineare Regression. Auftragung der Modellwerte gegen die Referenzmessungen (**A**) und Darstellung der PHB-Konzentration (Referenzwerte, durchgehende Linie) und die durch das Modell ermittelten (gestrichelte Linie) der Kultivierungen unter N-Mangel (orange) und NP_i-Mangel (blau).

Weiterhin wurde die Anwendung von LG2 für die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der PHB-Granula in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 untersucht. Im Vergleich zu NR war bei LG2 keine Einlagerung der Farbstoffmoleküle in der Zellmembran visuell feststellbar (**Abb. 33**). Zudem ermöglichte der kurzwelligere Anregungs- und Emissionsbereich eine differenzierte Darstellung der Chlorophyll/Phycocyanin-Fluoreszenz im Kontrast zu den PHB-Granula.

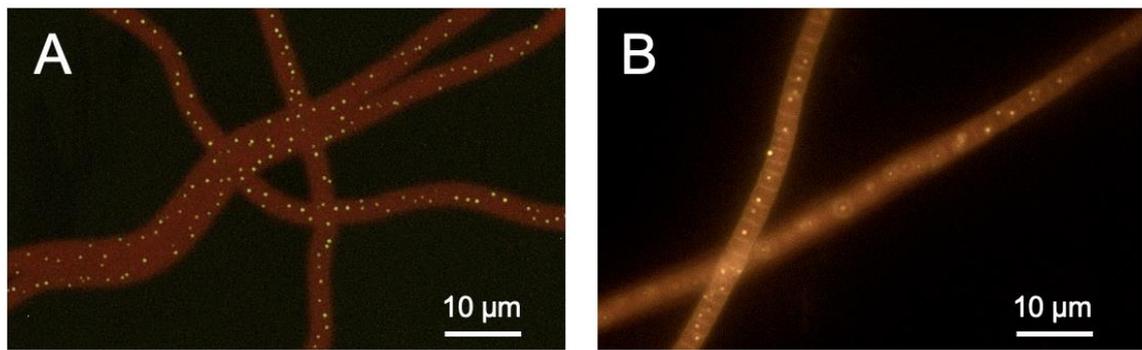


Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Polyhydroxybutyrat-Granula in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 mit den Farbstoffen LipidGreen2 (A) und Nile red (B).

4.4.2 Biomassebildungs- und Lipid-Zusammensetzung in eukaryotischen Mikroalgen

Die Kulturen *N. salina*, *P. purpureum* und *Stichococcus* sp. wurden im jeweiligen Medium (**Kapitel 3.3.3**) unter ausbalancierten Wachstumsbedingungen angezogen und anschließend unter N-Mangel über einen Zeitraum von 14 d kultiviert und beprobt. Dabei ergaben sich für die Organismen eine unterschiedliche Ausprägung der Biomassezunahme, Lipid- und TAG-Konzentrationen. *P. purpureum* wies eine konstante Biomassezunahme über den gesamten Kultivierungszeitraum auf, welche in finale 2,3 g L⁻¹ resultierte (**Abb. 34 A**).

Die Bildung des Lipidgehaltes geschah proportional zur TAG-Bildung und ergab Konzentrationen von 0,80 g L⁻¹ Gesamtlipid und 128 mg L⁻¹ TAGs. Das Wachstum von *N. salina* stagnierte über den gesamten Beprobungszeitraum. Sowohl die Biomasse als auch der Lipidgehalt nahm über den Messzeitraum nicht zu und endete in 0,65 g L⁻¹ Biomasse und 0,26 g L⁻¹ Gesamtlipid. Der TAG-Gehalt stieg währenddessen bis zum sechsten Beprobungstag an und stagnierte dann bei ca. 180 mg L⁻¹. Die Biomasse von *Stichococcus* sp. nahm über den Kultivierungsverlauf ebenfalls nur geringfügig von 0,61 auf 0,85 g L⁻¹ zu. Der Lipidgehalt hingegen stieg von 0,44 auf 0,72 g L⁻¹. Die TAG-Konzentration stieg ebenfalls über den Kultivierungszeitraum von 126 auf 300 mg L⁻¹ an.

Die Kulturen zeigten somit eine unterschiedliche Ausprägung des prozentualen TAG-Anteils zum Gesamtlipid (**Abb. 34 D**). Daraus resultierten maximale TAG-Anteile zum Gesamtlipid von 66,7 % (*N. salina*), 16,0 % (*P. purpureum*) und 41,1 % (*Stichococcus* sp.). Demnach ergab sich für *N. salina* das höchste TAG zu Lipid-Verhältnis, während *P. purpureum* das geringste aufwies. Das Verhältnis zwischen TAG zu Lipid von *Stichococcus* sp. befand sich zwischen denen von *N. salina* und *P. purpureum*.

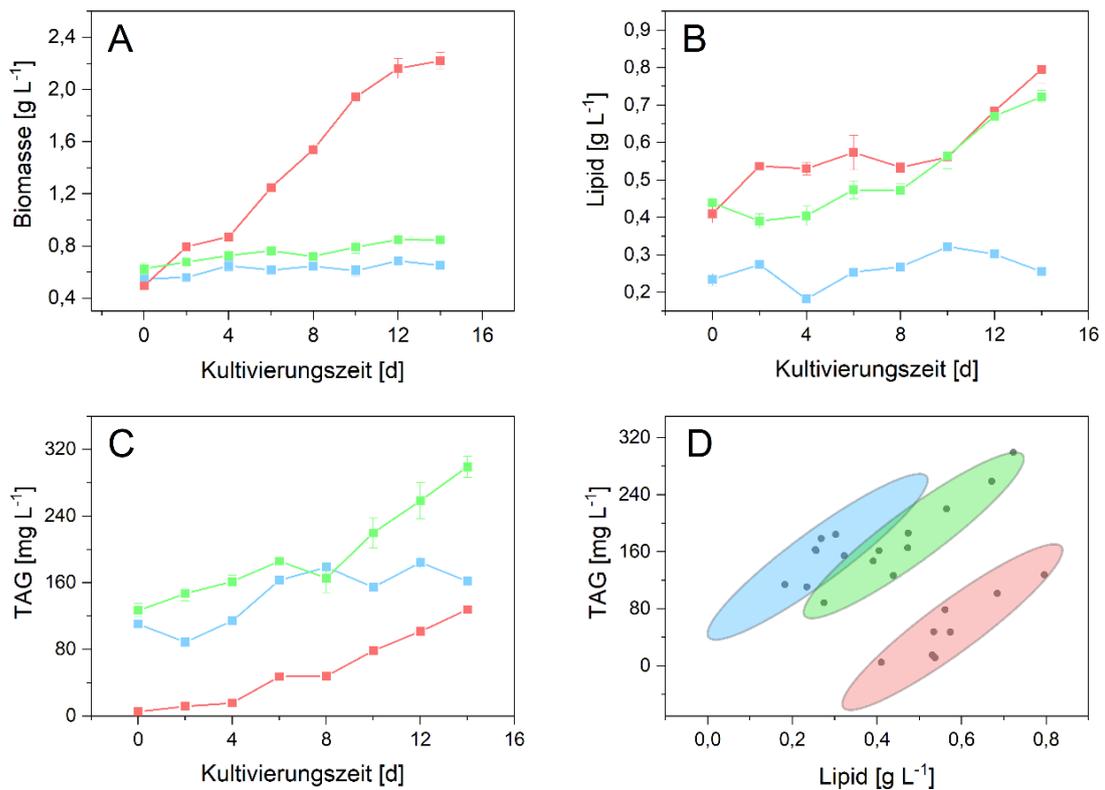


Abb. 34: Änderungen der Biomasse (A), Lipid- (B) und Triacylglycerol-Konzentration (C) von *Nannochloropsis salina* (blau), *Stichococcus* sp. WB02 (grün) und *Porphyridium purpureum* (rot) in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Gaussian Mixture Model des Verhältnisses der TAG- zur Lipid-Konzentration (D). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen dar.

4.4.3 Bestimmung der Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration in eukaryotischen Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die an *C. necator* entwickelte Fluoreszenzmethode auf PHB-produzierenden Cyanobakterien der Art *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 übertragbar war (**Kapitel 4.4.1**). In diesem Kapitel wurde die Übertragbarkeit der Methodik auf die Lipid-bildenden Mikroalgen untersucht. Die Modellierung wurde sowohl für die Daten jeder einzelnen Spezies als auch mit dem vereinigten Datensatz durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass mit den Daten der LG2-Punktmessung bei 510 nm bessere Modelle erstellt werden konnten als mit der Fläche des Emissionssignals (**Tab. A 2**). Außerdem konnte eine höhere Modellgüte erzielt werden, wenn für die Modellierung die Daten aller drei untersuchten Organismen berücksichtigt wurden. Die Modelle (LR, KNN, SVM) ergaben vergleichbare Bestimmtheitsmaße und Geradenanstiege für die Zielgröße Biomasse (**Tab. 23**). Jedoch erwiesen sich auf Grundlage des Bestimmtheitsmaßes nur LR und KNN für die Bestimmung der Lipid- und TAG-Konzentration geeignet. Das Bestimmtheitsmaß von 0,9862 (LR) und 0,9879 (KNN) sowie die Abweichung zum optimalen Geradenanstieg (1,0) mit 0,01 waren dabei gleichwertig zueinander. Im Vergleich zwischen den Zielgrößen TAG und Lipid hatte das TAG-Modell mit LR ein höheres Bestimmtheitsmaß (0,9901) als das Lipid-Modell (0,9862), jedoch eine wesentlich höhere Fehlersumme (90356 zu 0,67).

Tab. 23: Modellergebnisse zur Bestimmung der Biomasse, Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration in den untersuchten eukaryotischen Mikroalgen. Modelle beinhalten die LipidGreen2-Fluoreszenz-Daten von *Nannochloropsis salina*, *Porphyridium purpureum* und *Stichococcus* sp. Modelle: LR: Lineare Regression, KNN: künstliches neuronales Netz, SVM: Support Vector Machines. Erstellt mit OriginPro.

	Modell	R ²	Anstieg m	Fehlersumme
Modell Biomasse	LR	0,9804	0,97	9,7
	KNN	0,9867	1,03	7,2
	SVM	0,9806	0,97	4,6
Modell Lipid	LR	0,9862	0,99	0,67
	KNN	0,9879	1,01	1,25
Modelle TAG	LR	0,9901	0,99	90356
	KNN	0,9671	0,08	20292,7

Das KNN-Modell konnte aufgrund des sehr geringen Geradenanstiegs (0,08) nicht für die TAG-Bestimmung berücksichtigt werden. Das Modell LR war auf Grund der hohen Korrelationskoeffizienten für alle untersuchten Zielgrößen (Biomasse, Lipid- und TAG-Konzentration) geeignet. Diese traf ebenfalls auf die Modellerstellung mit dem vereinigten Datensatz der Organismen zu (**Abb. 35**).

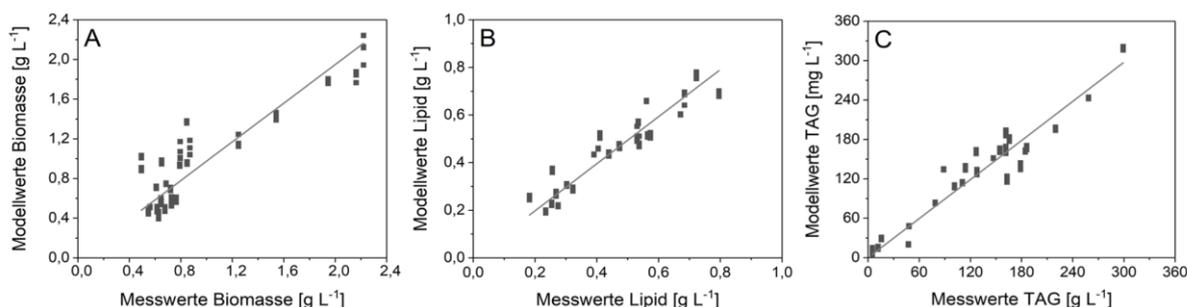


Abb. 35: Auftragung der Modellwerte gegen die Beobachtungen der Biomasse (**A**), Lipid-Konzentration (**B**) und Triacylglycerol-Konzentration (**C**) gegen die analytischen Messwerte. Modell: Lineare Regression, vereinigter Datensatz der Kulturen (vgl. **Abb. 34**) von *Nannochloropsis salina*, *Porphyridium purpureum* und *Stichococcus* sp. Erstellt mit OrginPro.

Im Rahmen der t-Tests wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzwerten und den Ergebnissen der Modelle festgestellt, unabhängig von der jeweiligen Kultur und Zielgröße (**Tab. 24**). Insbesondere die Zielgröße TAG erzielte die höchsten p-Wert unter Berücksichtigung aller Datenpunkte (0,9839). Die Daten der *N. salina*-Kultur führten allerdings zu einer Reduktion des p-Wertes für die Zielgrößen TAG und Lipid.

Tab. 24: t-Test-Ergebnisse der Bestimmung von Biomasse, Lipid- und Triacylglycerol-Konzentration durch das Modell Lineare Regression gegen die analytischen Referenzwerte. Datengrundlage basierte auf **Abb. 35**.

Kultur	p-Werte		
	Biomasse	Lipid	TAG
<i>Nannochloropsis salina</i>	0,8187	0,8899	0,9615
<i>Porphyridium purpureum</i>	0,9849	0,9898	0,9969
<i>Stichococcus</i> sp.	0,7609	0,9806	0,9933
Mittelwerte	0,8548	0,9534	0,9839

Bei Nichtberücksichtigung der *N. salina*-Daten lag nur ein geringer Unterschied der gemittelte p-Werte zwischen den Zielgrößen der Lipid-Konzentration und TAG-Konzentration vor. Ein ähnliches Schema war bei der Zielgröße der Biomasse feststellbar. Mit der Kultur *Porphyridium purpureum*, die auch über den Kultivierungsverlauf die höchste Biomassebildung aufwies ergab sich ebenfalls der höchste p-Wert (0,9849). Die beiden anderen Kulturen, bei denen die Biomassezunahme stagnierte verringerte die Modellgenauigkeit. Mit dem LR-Modell wurden anschließend die Messpunkte der Zielgrößen für alle drei Organismen unabhängig der phylogenetischen Distanz und morphologischen Unterschieden erfolgreich wiedergegeben (**Abb. 36**).

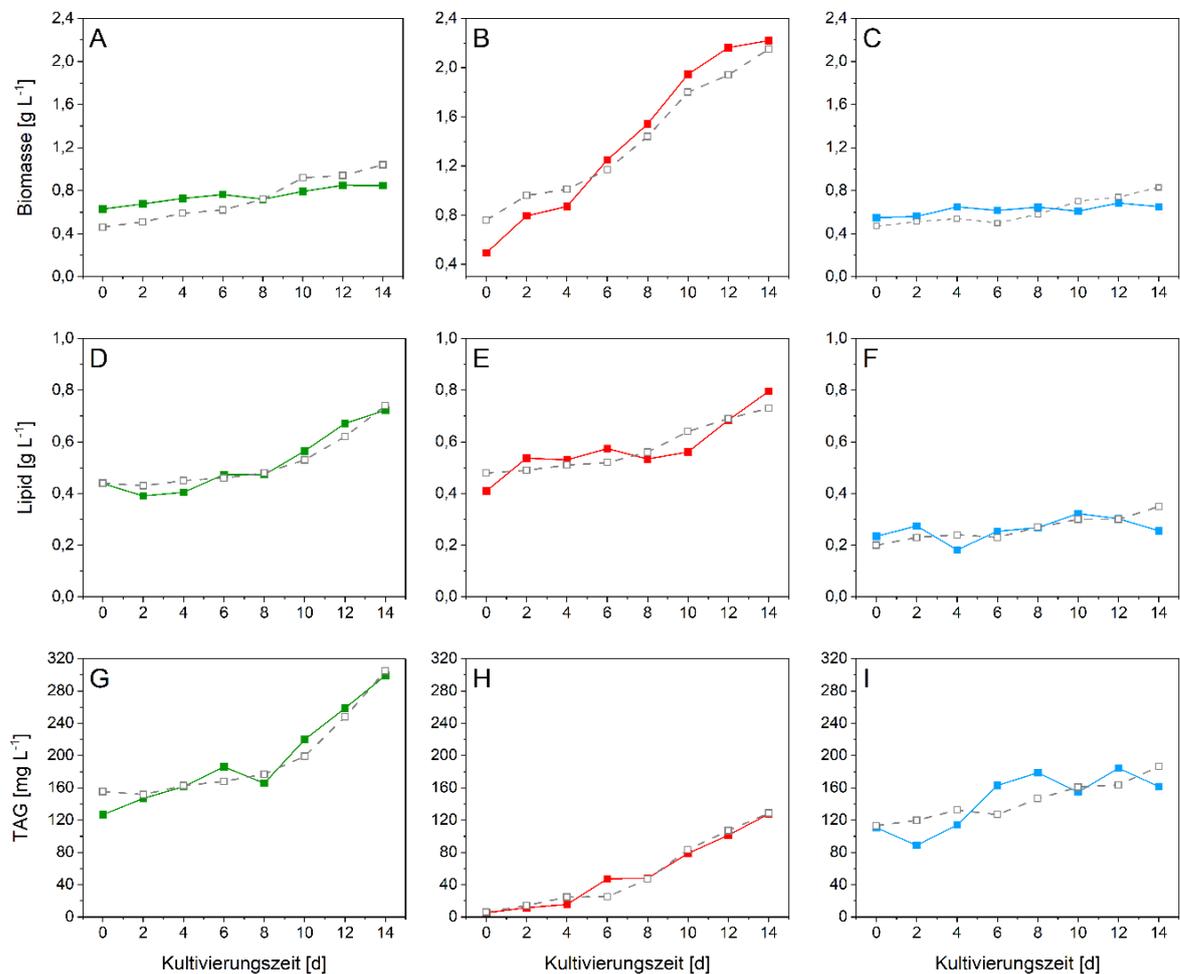


Abb. 36: Bestimmung der Biomasse (**erste Reihe**), Lipid- (**zweite Reihe**) und Triacylglycerol-Konzentration (**dritte Reihe**) durch das Modell Lineare Regression mit LipidGreen2-Fluoreszenzdaten. Organismen: *Stichococcus sp. WB02* (**grün, A, D, G**), *Porphyridium purpureum* (**rot, B, E, H**) und *Nannochloropsis salina* (**blau, C, F, I**). Modelldaten sind jeweils in grau, gestrichelt, analytische Referenzdaten in Farbe mit durchgehender Linie dargestellt. Erstellt mit OriginPro.

4.5 Differenzierung der Speicherlipidart durch LipidGreen2-Fluoreszenz

Wie in den vorherigen Kapiteln dargelegt wurde, ist die entwickelte Fluoreszenztechnik mit LG2 zur Bestimmung von PHB in *C. necator* (**Kapitel 4.2.3**), PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.4.1**) sowie zur Bestimmung von Lipid/TAG in den untersuchten eukaryotischen Mikroalgen (**Kapitel 4.4.3**) geeignet. Da die Fluoreszenz von solvatochromen Farbstoffen, wie LG2, von der Polarität der Umgebung abhängt, bestand das Ziel dieses Kapitels darin, eine Differenzierung der SL-Arten PHB und TAG auf Grundlage der LG2-Fluoreszenz vorzunehmen (**H4**). Dafür wurde die Häufigkeitsverteilung der Emissionspeaks (**Kapitel 4.5.1**) sowie die Eignung von Klassifizierungsmodelle untersucht (**Kapitel 4.5.2**).

4.5.1 Analyse der Häufigkeitsverteilungen der Emissionswellenlängen

Die Wellenlängen-Maxima der LG2-Fluoreszenz bei der Bestimmung von PHB in *C. necator* entsprachen über den Beprobungszeitraum hinweg weitestgehend einer Gaußschen-Normalverteilung (**Abb. 37 A**). Das Häufigkeitsmaximum lag bei 528 nm. Dabei erstreckte sich die Verteilung über einen Gesamtbereich von ca. 60 nm (505 – 565 nm). Durch Aufsplitten der Datensätze nach den jeweiligen Kulturbedingungen (Mangel, Stress) ergaben sich unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen (**Abb. 37 B**). Die Proben aus der P_i-Mangel-Kultivierung wiesen das langwelligste Häufigkeitsmaximum von 547 nm auf, gefolgt von der Kultivierung mit NaCl-Zusatz (531 nm). Das kurzwelligste Häufigkeitsmaximum war bei der N-Mangel-Kultivierung feststellbar (523 nm). Die Verteilungsbreiten waren jedoch weitestgehend kulturunabhängig und erstreckten sich über einen Bereich von ca. 50-60 nm. Die Emissionswellenlängen bei der PHB-Messung mit dem Organismus *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 zeigten eine langwelligere Häufigkeitsverteilung auf, wobei das Maximum unter Berücksichtigung aller Messungen bei 549 nm lag (**Abb. 37 C**). Die Aufsplittung der Datensätze nach den Kultivierungsbedingungen ergab für die N-Mangel und die NP_i-Mangel-Kultur unterschiedliche Maxima. Dabei erstreckten sich die Emissionswellenlängen der NP_i-Mangel-Kultur über einen breiteren Bereich (535 nm bis 560 nm) (**Abb. 37 D**). Das Maximum der Verteilung entsprach dabei mit 547 nm ungefähr dem der N-Mangel-Kultur (550 nm). Verglichen mit den Verteilungen bei *C. necator* war das durchschnittliche Maximum der am häufigsten auftretenden Wellenlänge (528 nm) um 21 nm bathochrom verschoben.

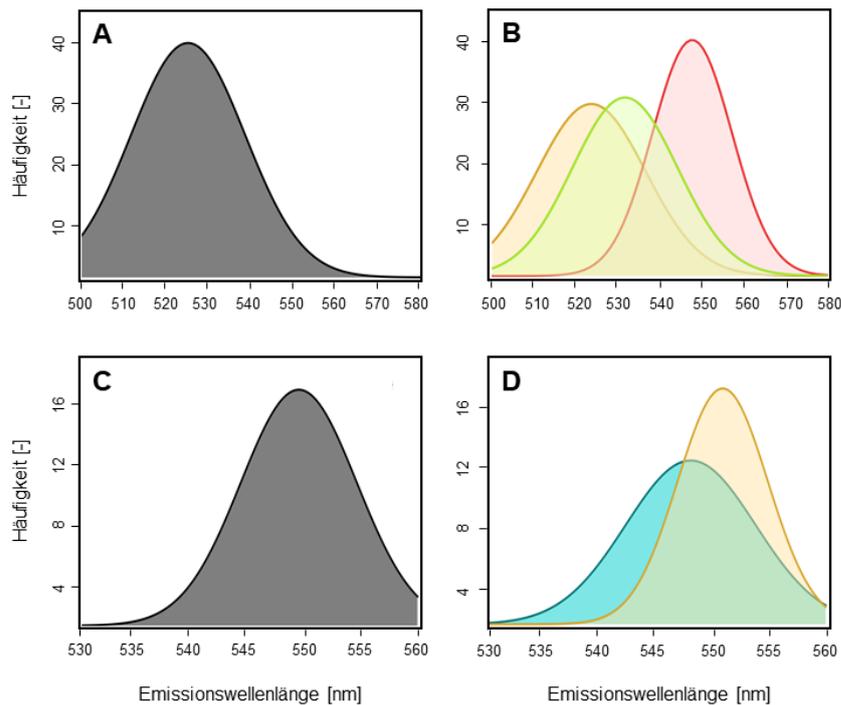


Abb. 37: Häufigkeitsverteilung der Emission bei der Polyhydroxybutyrat-Bestimmung mit LipidGreen2 bei *Cupriavidus necator* (**A, B**) und *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**C, D**). **A, C:** Durchschnittliche Verteilung unter Berücksichtigung aller Daten, **B:** Aufspaltung nach der Kultivierungsbedingung. Orange: N-Mangel, Grün: NaCl-Zugabe, rot: P_i-Mangel. **D:** Aufspaltung nach der Kultivierungsbedingung. Orange: N-Mangel, Blau-grün: NP_i-Mangel.

Die kürzesten detektierten Emissionswellenlängen lagen unter Berücksichtigung aller Messungen mit *C. necator* bei 509 nm und mit *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 bei 528 nm (**Tab. 25**). Die Emissionswellenlängenverteilung bei der Lipid/TAG-Bestimmung in eukaryotischen Mikroalgen erstreckte sich unter Berücksichtigung aller untersuchten Organismen und Messungen zwischen 506 – 575 nm (**Abb. 38 A**). Die maximale Häufigkeit der Emission lag bei *P. purpureum* (517 nm) und bei *Stichococcus* sp. WB02 (519 nm) sehr nah beieinander. Dieses traf auch auf die kürzeste Emissionswellenlänge beider Spezies zu, die 506 nm (*Stichococcus* sp.) und 508 nm (*P. purpureum*) betrug. Die Verteilung der Emissionswellenlängen der *N. salina*-Kultur war zu den anderen Spezies bathochrom verschoben. Daraus ergab sich ein langwelligeres Emissionsmaximum von 542 nm. Die kürzeste Emissionswellenlänge wurde bei 525 nm erfasst.

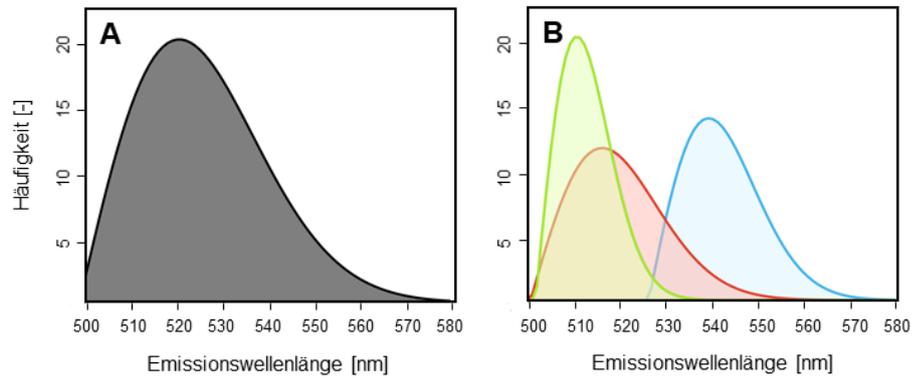


Abb. 38: Häufigkeitsverteilung der Emission bei der Lipid/Triacylglycerol-Bestimmung in eukaryotischen Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz. Berücksichtigung aller Messungen (**A**) und nach Aufsplittung nach Organismus-Typ (**B**). Spezies: *Nannochloropsis salina* (blau), *Stichococcus* sp. WB02 (grün) und *Porphyridium purpureum* (rot).

Tab. 25: Übersicht der Ergebnisse der Emissionswellenlängen-Häufigkeitsverteilung. Em_{min} : Kürzestes Emissions-Wellenlängenmaximum, $H_{Em_{max}}$: Häufigstes Emissionswellenlängenmaximum. Fluoreszenzfarbstoff Lipidgreen2., PHB: Polyhydroxybutyrat, TAG: Triacylglycerol

Speicherlipid	Organismus	Kulturbedingung	Em_{min} [nm]	$H_{Em_{max}}$ [nm]
PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	alle		522
		N-Mangel	509	519
		P _i -Mangel	528	546
		NaCl-Stress	510	523
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	alle		544
		N-Mangel	538	549
TAG	<i>Nannochloropsis salina</i>	N-Mangel	525	542
		<i>Stichococcus</i> sp. WB02	N-Mangel	506
	<i>Porphyridium purpureum</i>	N-Mangel	508	517

4.5.2 Modell-gestützte Klassifizierung

Im Rahmen der Untersuchung zur Unterscheidung der Emissionswellenlängen-Verteilung wurden neben der Analyse der Häufigkeiten auch fünf verschiedene Klassifizierungsmodelle betrachtet. Dabei wurde die Wellenlängenverschiebung, die Intensität der Farbstoffmoleküle in lipophiler Umgebung (Intensität bei Emissionswellenlängenmaximum) sowie die Intensität der Moleküle im polaren Milieu (Intensität bei 560 nm) berücksichtigt (**Abb. A 6**).

Die höchsten Klassifizierungsgenauigkeiten (CA) wurden bei den Modellen SVM und KNN erzielt (**Tab. 26**). Die Modelle Entscheidungsbaum (TR) und Logistische Regression (LRE) wiesen hingegen eine geringere Genauigkeit auf, mit einer CA von 0,683 bzw. 0,633. Das Naive-Bayes-Modell (NB) lag mit einer CA von 0,872 im mittleren Bereich der getesteten Modelle. Die höchste Präzision (Precision), die den Anteil der korrekt-positiven Ergebnisse unter allen als positiv eingestuften Instanzen wiedergibt, konnte mit SVM (0,915) erreicht werden.

Tab. 26: Test and Score Ergebnisse der untersuchten Modelle zur Klassifizierung der Speicherlipidart (Polyhydroxybutyrat, bzw. Triacylglycerol) auf Basis der Lipidgreen2-Fluoreszenz. AUC: Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve CA: Klassifizierungsgenauigkeit; Precision: Anteil der korrekt-positiven Ergebnisse unter allen als positiv eingestuften Instanzen

Modell	AUC	CA	Precision
Entscheidungsbaum	0,587	0,683	0,695
Logistische Regression	0,753	0,633	0,648
Naive Bayes	0,871	0,872	0,874
Künstliches Neuronales Netz	0,953	0,880	0,880
Support Vector Machines	0,963	0,912	0,915

Die Auftragung der Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operating Curve, ROC), die visuell die Abhängigkeit der Effizienz mit der Fehlerrate darstellt, verdeutlicht, dass TR keine erfolgreiche Zuordnung der Klassen über den gesamten Bereich wiedergibt (**Abb. 39**). Die anderen Modelle zeigten hingegen eine hohe CA über alle Messinstanzen. Das Flächenintegral der ROC-Kurve (Integral unter der Kurve, AUC), kann dabei ebenfalls die Genauigkeit der Klassifizierung wiedergeben.

Hierbei sollte der AUC-Wert über 0,5 (Grenzwert für Zufall) liegen. Das höchste Integral wurde mit KNN (0,953) und SVM (0,963) für den Durchschnitt der Klassen (PHB und TAG) erzielt (**Tab. 26**). Um zu untersuchen, ob die Klassifikation mit KNN und SVM unabhängig von den Zielgrößen äquivalent ist, wurde das Vorhersagekriterium anhand der Confusion-Matrix ermittelt (**Tab. 27**). Diese gibt das prozentuale Verhältnis von korrekt zugeordneten Instanzen zu inkorrekt zugeordneten wieder. KNN zeigte dabei eine äquivalente Vorhersagepräzision für PHB (89 %) und TAG (87 %). Mit SVM stieg die Genauigkeit für Lipid/TAG auf 95,3 %, während die Vorhersagepräzision für PHB mit 87 % zu der von KNN ähnlich war. Daher eignen sich sowohl KNN als auch SVM für die Klassifizierung von PHB, während SVM für Lipid/TAG eine höhere Vorhersagepräzision aufwies. Basierend auf diesen Daten ist KNN ein geeignetes Modell zur Unterscheidung von PHB- und Lipid/TAG-Daten auf Grundlage der LG2-Fluoreszenzdaten.

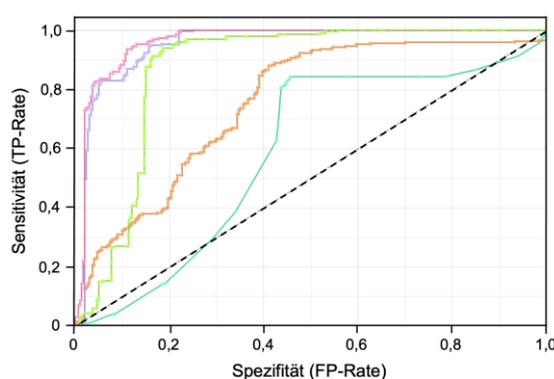


Abb. 39: Grenzwertoptimierungskurven der Klassifizierungsmodelle zur Differenzierung der Speicherlipidarten Polyhydroxybutyrat und Triacylglycerol durch LipidGreen2-Fluoreszenz. Modelle: Entscheidungsbaum (cyan), Logistische Regression (orange), Naive Bayes (grün), künstliches neuronales Netzwerk (violett) und Support Vector Machines (rot). Einstellungen: Zufalls-Sampling mit 100-facher Wiederholungen bei 90 % Testgröße; Normalisierung, ($n_{\text{PHB}} = 29$, $n_{\text{TAG}} = 24$).

Tab. 27: Verhältnis korrekt zu falsch zugeordneten Polyhydroxyalkanoat- und Triacylglycerol-Instanzen. Methode: Confusion-Matrix, Einstellungen: Zufalls-Sampling mit 100-facher Wiederholungen bei 90% Testgröße; Normalisierung, ($n_{\text{PHB}} = 29$, $n_{\text{TAG}} = 24$).

Modell	Eingabe	Vorhersage	
		PHB	TAG
Künstliches Neuronales Netz	PHB (100 %)	89,0 %	11,0 %
	Lipid/TAG (100 %)	13,0 %	87,0 %
Support Vector Machines	PHB (100 %)	87,0 %	13,0 %
	Lipid/TAG (100 %)	4,7 %	95,3 %

5 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Bildung von PHB in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 von verschiedenen Faktoren wie der Art der Kultivierung und dem Vorhandensein von abiotischen und biotischen Faktoren abhängt (**Kapitel 4.3**). Zudem hat sich der Farbstoff LG2 auf Grund der molekularen Eigenschaften (**Kapitel 4.1**) als universell einsetzbar erwiesen, um PHB und Lipid/TAG in *C. necator* (**Kapitel 4.2.1**), *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.4.1**) sowie in ausgewählten eukaryotischen Mikroalgen (**Kapitel 4.4.3**) zu bestimmen und die SL-Arten voneinander zu differenzieren (**Kapitel 4.5**).

Im folgenden Abschnitt werden die zentralen Ergebnisse der vorliegenden Studie im Zusammenhang mit den zu Beginn aufgestellten Hypothesen und Forschungsfragen (**Kapitel 2**) diskutiert. Im **Kapitel 5.1** werden die Ergebnisse der molekularen Eigenschaften von LG2 sowie der Effekt von abiotischen und biotischen Einflussfaktoren auf den Färbeprozess (**Bezug zu H1**) erläutert. **Kapitel 5.2** widmet sich der Diskussion der Ergebnisse zu den Auswirkungen der mixotrophen Mangelbedingungen auf die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Bezug zu H2**). Im **Kapitel 5.3** wird die Übertragbarkeit der Fluoreszenzmethode auf PHB- und Lipid/Tag-produzierende Mikroalgen (**Bezug zu H3**) in Abhängigkeit der phylogenetischen Distanzen und zellmorphologischen Unterschiede erörtert. In **Kapitel 5.4** wird die Möglichkeit der Differenzierung von PHB- und TAG-produzierenden Mikroalgen durch LG2-Fluoreszenz (**Bezug zu H4**) behandelt.

5.1 Fluorometrische Polyhydroxybutyrat- und Biomasse-Bestimmung in *Cupriavidus necator* mit LipidGreen2

Durch Modell-gestützte Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die mit LG2 entwickelte Fluoreszenzmethode sehr gut für reproduzierbare Messung der Biomasse- und PHB-Konzentration in *C. necator* einsetzen ließ. Mit Bezug zur **Hypothese H1** werden folgend die Ergebnisse der molekularen Eigenschaften von LG2 und der Auswirkung abiotischer und biotischer Einflussfaktoren auf den Färbeprozess (**Kapitel 5.1.1**) sowie die Modellerstellung and Anwendung (**Kapitel 5.1.2**) diskutiert.

5.1.1 Einflussgrößen auf die LipidGreen2-Fluoreszenz

Die durchgeführten Messungen bestätigten für die Farbstoffe NR und LG2 ein solvatochromes Verhalten. Bei der Bestimmung von PHB mit NR und LG2 verringerten sich die Emissionswellenlängen um etwa 50 nm (**Abb. 11**). Die in der 3DEEM resultierenden Anregungswellenlängen von 440 nm (LG2) und 525 nm (NR) können durch Literaturangaben bestätigt werden. Dabei wurden Anregungsbereiche von 488 - 540 nm für NR und 450 nm – 440 nm für LG2 beschrieben [129,154,218,219].

Bei der Ermittlung der Quantenausbeute zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden untersuchten Farbstoffen (**Abb. 12**). Für NR wurde eine Quantenausbeute von 0,29 in DMSO beschrieben [217]. Da der Anstieg der linearen Gleichung aus Absorption und Fluoreszenzemission unmittelbar im Verhältnis zur Quantenausbeute steht, konnte für LG2 eine Quantenausbeute von $0,26 \pm 0,1$ ermittelt werden. Dies entspricht einer verringerten Fluoreszenzeffizienz von 10 %. Da für das Erreichen einer gleichen Absorptionskapazität von LG2 im Vergleich zu NR eine 10-fach höhere Konzentration benötigt wurde, ist die auf die Stoffmenge bezogene Absorptionsfähigkeit von LG2 deutlich geringer. Zudem variieren die Kosten der beiden Farbstoffe erheblich. Während der Preis von NR 0,40 EUR μmol^{-1} beträgt, liegt der Preis für LG2 bei 15,50 EUR μmol^{-1} [220,221].

Um die gleiche Fluoreszenzintensität unter Berücksichtigung des Preises und der einzusetzenden Stoffmenge zu erzielen, müssen daher wesentlich höhere Kosten für LG2 aufgewendet werden.

Um das Verhalten der Farbstoffe zu untersuchen, wurden Langzeitmessungen durchgeführt. Dabei wurden a) der Rückgang der Fluoreszenzintensität in Relation zur Bestrahlungsdauer und b) der Einfluss der Umgebungsbeleuchtung während des Inkubationsprozesses zwischen Farbstoff und Kultursuspension analysiert. NR wies keine Langzeitbeständigkeit in beiden Umgebungen auf. Die planare Struktur führt zu einer Kristallisation im polaren Medium (**Abb. A 7**), wodurch die Fluoreszenzemission durch nicht-fluoreszierende Aggregation beeinträchtigt wird [176,222]. Dies erklärt den logarithmischen Abfall der Intensität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. In lipophiler Umgebung hingegen war zu Beginn der Messung ein Anstieg des Signals feststellbar. Da der Farbstoff allerdings in übermäßiger Menge hinzugefügt wurde, konnten sich nicht alle Moleküle in den Granula einlagern. Daher ist der Rückgang des Signals nach dem Erreichen des Intensitätsmaximums bei NR während des Färbvorgangs von PHB auf Quenching-Effekte, der noch in der polaren Umgebung vorhandenen freien Moleküle zurückzuführen.

Die Resultate der Untersuchung bezüglich des Einflusses der Belichtung während des Färbeprozesses waren eng mit den Resultaten der Langzeitmessung verbunden. Unabhängig von der Lichtstärke zeigte sich in polarer Umgebung ein logarithmischer Abfall der Intensität. Dieser war bei den Proben, die unter Starklicht inkubiert wurden, um etwa 18 % höher als bei jenen, die unter Lichtausschluss inkubiert wurden.

Die Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Inkubation unter lipophiler (PHB) Umgebung führte zu einer geringeren Stabilisierung, was den Einfluss der Lichtstärke auf die Fluoreszenzintensität verstärkte und zu höheren Signalunterschieden führte. Die Intensität stieg bei den Proben, die unter Raumlicht oder Lichtausschluss inkubiert wurden, über den gesamten Messzeitraum an, wobei es nach 120 Minuten zu einer Änderung von 23 % kam. Somit zeigt auch die Inkubation unter Raumlicht einen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, der mit zunehmender Inkubationszeit zunimmt.

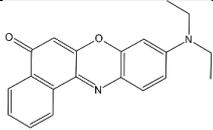
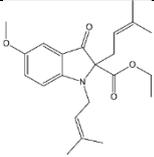
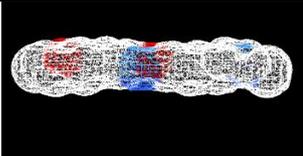
Im Vergleich zu NR zeigte LG2 eine hohe Langzeitstabilität bei minimalem Einfluss von Photobleaching-Effekten in polarer und lipophiler Umgebung. Im Unterschied zu NR wurden keine zeitabhängigen Signalverluste festgestellt. Dies lässt sich durch die kugelförmige Molekülstruktur erklären, welche im Gegensatz zu NR die Bildung von nicht-fluoreszierenden planaren Molekülansammlungen verringert (**Tab. 28**) [176].

Mikroskopische Aufnahmen unterstützen diese Annahme (**Abb. A 7**). Während der Inkubation mit *C. necator* Zellen wurde die maximale Intensität nach 120 min erreicht (**Abb. 13**). Der lineare Anstieg der Intensität in den ersten 100 min des Inkubationsprozesses kann bei fluoreszenzbasierten Bestimmungen gut berücksichtigt werden. Der Zuwachs des Fluoreszenzsignals in der Langzeitmessung kann als Indikator für die zeitliche Diffusion der Farbstoffmoleküle in die PHB-Granula angesehen werden [176]. Der geringere Anstieg während der Inkubation ist wahrscheinlich ein Resultat des um 24 % höheren molekularen Volumens von LG2 (363 Å³), verglichen zu NR (292 Å³).

Starke Belichtung resultierte in einer Reduktion der Fluoreszenzintensität. Bei Raumlicht sind die Intensitätsunterschiede bis zu einer Inkubationszeit von 20 min im Vergleich zu den unter Lichtausschluss inkubierten Proben vernachlässigbar. Erst ab einer Inkubationszeit von ca. 50 min wirkt sich die Belichtung messbar negativ auf die Fluoreszenz aus. Da eine möglichst kurze Inkubationszeit von weniger als 20 min für die zeitnahe Bestimmung der SL angedacht war, kann die Inkubation demnach unter Raumlicht durchgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt der Anwendung von LG2 stellt die Nutzung im Bioimaging dar. LG2 erwies sich als geeignet zur Markierung von PHB-Granula (**Abb. 33**) und Lipid-Körpern (**Abb. 40**) in den untersuchten Organismen. Dabei wurde im Vergleich zu NR keine Färbung der Zellmembran beobachtet. Die höhere Affinität zu den SL könnte durch den höheren Hydrophobizitätsindex von LG2 (5,9, vgl. NR: 4,6) erklärt werden. [133,176].

Tab. 28: Vergleich der molekularen Eigenschaften von Nile red und LipidGreen2.

	Nile red	LipidGreen2
Struktur		
Oberflächendarstellung Molekülgeometrie (weiß: Kohlenstoff, Blau: Sauerstoff, rot: Stickstoff)		
Summenformel	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂	C ₂₂ H ₂₉ NO ₄
Molekulargewicht [Da]	318	371
Volumen [Å ³]	292	363
Hydrophobizität: (clogP)	4,6	5,9
λ _{ex} / λ _{em} (polar) [nm]	595 / 660	460 / 560
λ _{ex} / λ _{em} (unpolar) [nm]	550 / 610	440 / 505
Quantenausbeute [-]	0,29	0,26

Um eine schnelle Quantifizierung von PHB zu ermöglichen, wurden die Faktoren, die am Färbeprozess beteiligt waren, dahingehend analysiert und optimiert, dass die Inkubationszeit verkürzt und die Fluoreszenzintensität maximiert wird. Dabei spielten bei BY die Farbstoffkonzentration, der Puffertyp und die Biomassekonzentration eine untergeordnete Rolle. Die kurze Inkubationszeit und die hohen Emissionsintensitäten sind auf das niedrige Molekulargewicht- und Volumen (262 g mol⁻¹, 269 Å³) zurückzuführen, die das Durchdringen des Farbstoffs durch die Zellmembran begünstigen. Die Inkubationszeit von BY war dabei wesentlich geprägt von den Wechselwirkungen der Parameter.

Aufgrund des deutlich höheren Molekulargewichts- und Volumens von LG2 und NR waren die Faktoren der Biomasse-Konzentration und die Farbstoffkonzentration bei der Färbung von entscheidender Bedeutung (**Abb. 14**). Insbesondere bei LG2, der von allen getesteten Farbstoffen das höchste Molekulargewicht aufwies, wurde der Färbeprozess entscheidend von der Biomassekonzentration beeinflusst. Diese Erkenntnis kann durch die Stabilitätsmessungen des Farbstoffs bestätigt werden (**Kapitel 4.1.3**).

Dabei war der Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationszeit geringer als bei NR. Zur Erzielung vergleichbarer Fluoreszenzintensitäten müssen bei einer Verkürzung der Inkubationszeit demnach höhere Carrier-Solvent- und Farbstoffkonzentrationen eingesetzt werden, um den Einfluss der langsameren Diffusion der Farbstoffe in die lipophilen Zielstrukturen entgegenzuwirken. Diese ist auch bei der einzusetzenden Biomasse erkennbar. Hierbei musste für LG2 für die Inkubationszeitpunkte 1 min und 2 min eine verringerte Biomasse eingesetzt werden, als für längere Inkubationszeiten. Demnach kann auch bei einer Zunahme der Inkubationszeit eine geringere Farbstoffkonzentration verwendet werden. Unabhängig vom Farbstoff konnte durch die angepassten Färbeprotokolle eine hohe Fluoreszenzintensität ab 5 min Inkubationszeit umgesetzt werden (**Abb. A 2**).

Im Gegensatz zu NR und LG2 zeigte BY kein solvatochromes Verhalten (**Abb. A 8**). Polaritätsempfindliche Eigenschaften solvatochromer Farbstoffe sind für die Küvetten-basierte Speicherlipid-Quantifizierung jedoch vom Vorteil, da eine Differenzierung zu den Molekülen, die nicht in den hydrophoben PHB-Granula gebunden sind, vorgenommen werden kann [219,223]. Demnach resultiert eine Bestimmung mit BY immer in einer zu berücksichtigenden Hintergrundfluoreszenz. BODIPY-Farbstoffe wurden trotzdem auf Grund der hohen Quantenausbeute in mehreren Studien zur Markierung und Bestimmung von lipophilen Zielstrukturen, vor allem mit durchflusszytometrischen Methoden, eingesetzt [105,171,224].

Die Analyse und gezielte Optimierung des Fluoreszenzfärbeprozesses stellen einen Neuwert in dieser Arbeit dar. Eine Recherche ergab keine vergleichbaren Studien, die den Färbeprozess auf diese Weise untersucht und verbessert haben. In den Studien, die sich mit der Optimierung des Färbeprozesses beschäftigten, wurde die OFAT-Methode (One Factor-at-a time, ein Faktor nach dem anderen) [125,225]. Im Gegensatz dazu bietet die in dieser Arbeit verwendete DoE mehrere Vorteile, einschließlich der Aufschlüsselung von Parameterinteraktionen und der Möglichkeit, den Färbeprozess iterativ zu optimieren.

5.1.2 Modellierung der Biomasse- und Polyhydroxybutyrat-Bildung durch Fluoreszenz

Bei der Messung von PHB durch Fluoreszenz ist aufgrund der vielseitigen Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal eine direkte lineare Beziehung zu analytischen Messwerten schwierig zu erzielen. Die Biomasseänderungen- und Morphologie wirken sich dabei direkt auf die Fluoreszenz aus. Die durch die sich ändernde Biomasse resultierenden IFE streuen sowohl das Anregungs- als auch Emissionslicht und nehmen mit zunehmender Biomassekonzentration zu [168].

Um die Einflussgröße IFE zu minimieren, wurde das Einstellen der Biomasse auf einen konstanten OD-Wert (0,1) beschrieben [218]. Das Einstellen auf einen festen OD-Wert zeigt jedoch mehrere Nachteile: Der OD-Wert von 0,1 stellt bei vielen Geräten die Detektionsuntergrenze dar, (ii) es wird oftmals ein weiteres Gerät benötigt, da nicht alle Fluoreszenzspektrometer Transmissionslicht aufzeichnen können und (iii) das Verdünnen von hohen Biomasse-Konzentrationen ist stark fehlerbehaftet. Bei Verzicht des Einstellens auf eine definierte Biomassekonzentration durch OD-Messungen muss daher eine nachgängige Korrektur des Fluoreszenzsignals vorgenommen werden. Zur Korrektur wurden mehrere Verfahren beschrieben. Dazu zählen neben der Korrektur durch den OD-Wert verschiedene mathematische Modelle als auch Korrekturverfahren durch das Raman-Signal der Probe [168,226,227].

Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung des Seitwärtsstreulichts (SSC) dar. Streulichtwerte werden in der Durchflusszytometrie ebenso genutzt, um das Volumen (Forward Scatter) und die Menge sowie Granularität (SSC) der Zellen abzuschätzen [228,229]. Da Fluoreszenzmessungen im 90°-Winkel aufgezeichnet werden, kann somit gleichzeitig der SSC unter den jeweiligen spektralen Einstellungen ermittelt werden.

Diese Herangehensweise wurde in dieser Arbeit genutzt, um (i) das Fluoreszenzsignal hinsichtlich einer höheren Korrelation zum PHB-Gehalt zu korrigieren und (ii) gleichzeitig mit diesem Wert die Biomasse-Konzentration zu ermitteln. Durch die hohe Korrelation der gemessenen Biomassekonzentration zum SSC-Wert konnte die Eignung der methodischen Durchführung für die Bestimmung der Biomasse bestätigt werden.

Dabei zeigte diese Herangehensweise zu den bislang beschriebenen Methoden wie die der Biomassebestimmung durch die NADPH-Fluoreszenz, wesentliche Vorteile, da der Redox-Zustand der Zelle unberücksichtigt bleibt und die Exzitations- und Emissionswellenlängen nicht angepasst werden müssen [230]. Dabei war die Quantifizierung der Biomasse für die spektralen Bereiche aller drei Farbstoffe möglich (**Abb. 17**). Die Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Bestimmung der Biomasse im Bereich des blaugrünen Spektrums (BY, LG2) präziser war als im roten Spektrum (NR). Dies lässt sich damit erklären, dass das Verhältnis zwischen Zellgröße und Wellenlänge das Streuverhalten beeinflusst. Dabei gilt, Je größer die Wellenlänge, desto geringer ist die Resonanz und die Menge des gestreuten Lichts [231]. Daher wird in der Durchflusszytometrie ein 405 nm- oder 488 nm-Laser eingesetzt. Die verwendeten Exzitationswellenlängen von 440 nm (LG2) bzw. 450 nm (BY) befanden sich im selben Bereich. Im Gegensatz dazu lag die Wellenlänge von NR (525 nm) außerhalb, was zu einer geringeren Lichtstreuung führte.

Die SSC-basierten Bestimmungen der Biomasse waren daher bei der Parameterkonstellation von BY und LG2 besser als mit den Wellenlängen von NR, die eine gemittelte Abweichung von 17 % zu den analytischen Messwerten aufwies. Die niedrigen Intensitäten im roten Spektrum lassen sich weiterhin durch die geringere Empfindlichkeit des Photomultiplier-Detektors erklären, die im Vergleich zum blauen Bereich ca. 50 % geringer ausfällt [232].

Die resultierenden linearen Regressionsmodelle der *C. necator* unter N-Mangel erwiesen sich als Kalibrierungsmodell für Folge-Kultivierungen (N-Mangel, P_i-Mangel und NaCl-gestressten Kulturen) sehr gut anwendbar. Der lineare Zusammenhang im getesteten Bereich konnte weiterhin durch Modell-gestützte Analysen bekräftigt werden (**Abb. 20**). Dabei erwies sich das Modell der linearen Regression (LR) als zielführende Methode für alle untersuchten Kulturen und es wurden keine signifikanten Unterschiede zu den analytischen Referenzwerten ermittelt. Die Genauigkeit auf Basis des p-Wertes war jedoch kulturabhängig. Da die Kalibrierung mit einer N-Mangelkultur durchgeführt wurde, konnte der höchste p-Wert ebenfalls bei der N-Mangel-Kontrollkultur (p = 0,9680) ermittelt werden. Die Daten der P_i-Mangelkultur (p = 0,9533) und die NaCl-gestresste Kultur (p = 0,8856) zeigten demnach eine höhere Abweichung zu den analytischen Referenzwerten.

Daraus lässt sich schließen, dass aufgrund der unterschiedlichen Stressbedingungen es ebenfalls zu unterschiedlichen zellmorphologischen Ausprägungen kommen kann, die sich wiederum negativ auf die Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit auswirken können. Trotzdem zeigte der SSC für die Bestimmung der Biomasse-Konzentration von *C. necator* eine hohe Anwendbarkeit und stellt eine alternative zur NIR-Spektroskopie dar, die in Bioreaktoren zum on-line Monitoring der Biomassebildung eingesetzt wird [233].

Der ausgeprägte lineare Zusammenhang der Biomasse zum SCC wurde weiterhin genutzt, um das Fluoreszenzsignal in Bezug auf den Einfluss der inneren Filtereffekte (IFE) bei der Bestimmung von PHB zu korrigieren. Zu diesem Zweck wurden Korrelationsuntersuchungen durchgeführt, die darauf abzielten, die Beziehung zwischen den PHB-Konzentrationen der analytischen Referenzwerte und den Fluoreszenzdaten zu verbessern (**Abb. 16**). Hierfür wurden mehrere Verrechnungen der Fluoreszenz (RF) mit dem SSC durchgeführt, um eine simple lineare Regression durchführen zu können. Anhand von t-Tests konnte gezeigt werden, dass alleinig mit der RF keine hohe Korrelation erzielt werden konnte ($p_{\max} = 0,64$, **Tab. 15**). Die Korrelationen zwischen SSC und RF sowie die Übertragbarkeit auf die N-Mangel, P_i-Mangel und NaCl-gestressten Kulturen wiesen hingegen eine stärkere Abhängigkeit vom jeweiligen Farbstoff als von der gewählten Korrekturmethode auf.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Farbstofftyp einen höheren Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Methode ausübt als die Korrekturmethode. Die Wahl eines geeigneten Farbstoffs, die Optimierung der Färbebedingungen und die Anwendung der Korrekturmethode gehen daher Hand in Hand und tragen zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit bei.

Der ausgeprägte lineare Zusammenhang konnte durch Modell-gestützte Analysen weiterhin bestätigt werden. Dafür wurden die Rohdaten ohne jegliche Verrechnung für die Modellbildung genutzt. Von den drei angewandten Modellen (LR, KNN und SVM) erwies sich LR mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten (0,966) als am besten geeignet (**Tab. 16**). Allerdings wurde deutlich, dass die Genauigkeit von der Kultivierungstyp abhing. Die Daten der P_i-Mangel-Kultur zeigten dabei die geringste Korrelation, welches durch die stagnierende PHB-Bildung erklärt werden kann (**Tab. 18**). Dieses unterlegt die zuvor gewonnene Erkenntnis aus der Biomassebestimmung mittels SSC, dass die Berechnung präziser ist, wenn die untersuchenden Proben und das Kalibrierungsmodell demselben Kulturzustand (in diesem Fall: N-Mangel) entstammen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anwendung von Kalibrierdaten auf andere Kulturstände mit einer reduzierten Präzision verbunden ist. Die Erklärung, weshalb LR als Modell in einer besseren Prognose als KNN oder SVM resultierte, könnte dem linearen Zusammenhang der Daten zu Grunde liegen. Im Gegensatz zu LR, welche multiplen linearen Regressionen erstellt, bildet KNN Linearkombinationen als Ergebnis von Matrixoperationen [234,235]. Dabei werden auch nichtlineare Komponenten berücksichtigt. Eine Erhöhung der Layer im KNN auf mehr als 100 resultierte in einer weiteren Verringerung Modellgenauigkeit (Daten nicht aufgeführt), woraus sich schlussfolgern lässt, dass sich die verwendeten spektroskopischen Daten nicht gut mit dem komplexeren Modell KNN interpretieren lassen. Dieses kann auch die Begründung des schlechteren Abschneidens des Modells SVM sein.

Für weiterführende Experimente wäre es zielführend, eine umfangreichere Datenbank, die als Standardkurve fungiert, zu erstellen, um ein stabileres Modell zu generieren. Die Präzision der Modelle erhöhen sich dabei mit jedem weiteren Datensatz in der Datenbank selbstständig [236].

Zum aktuellen Zeitpunkt befindet sich die Integration von Methoden des maschinellen Lernens zur Beantwortung von biotechnologischen Fragestellungen noch in den Anfängen. Trotzdem existieren verschiedene Ansätze, die mithilfe von datengestützten Modellen Prognosen von Zielgrößen ermöglichen. So wurde unter anderem KNN eingesetzt, um die Glass-Übergangstemperatur von verschiedenen PHAs vorherzusagen oder die Populationsdynamik von PHB-Produzenten in gemischten mikrobiellen Kulturen zu prognostizieren [237,238]. Ebenso wurde KNN im Bereich der Fluoreszenz zur Reduktion der Dimensionalität von Fluoreszenzspektren und zur Vorhersage von Nebenprodukten in der Trinkwasserdesinfektion eingesetzt [239].

Die Bestimmung von biotechnologischen Zielgrößen (hier: PHB- und Biomassekonzentration) durch spektroskopische Daten und Modell-gestützter Analysen stellt somit einen Neuwert dar und differenziert sich von bereits veröffentlichten Studien.

5.2 Effekte auf Polyhydroxybutyrat-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

Die Ergebnisse der Analyse der Biomassezusammensetzung und der PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 4.3**) zeigten, dass die PHB-Bildung unter mixotrophen Mangel-Bedingungen induziert wird und mit der Glykogen-Mobilisierung zusammenhängt. In diesem Kapitel werden die abiotischen und biotischen Einflussgrößen sowie die Mangel-Bedingungen auf den PHB-Bildungsprozess (**H2**) diskutiert (**Kapitel 5.2.1**). Weiterhin wird die Speicherlipidzusammensetzung (**Kapitel 5.2.2**) und der molekulargenetische Nachweis des PHB-Synthase-Gens (**Kapitel 5.2.3**) dargestellt.

5.2.1 Kultivierungsbedingungen und Einflussfaktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung

Die Identifikation geeigneter Kultivierungsbedingungen zur Induktion der PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 beruhte auf einer Metadatenanalyse aus Peer-Review Publikationen. Die ermittelten Daten verdeutlichten, dass der Großteil der Untersuchungen mit Cyanobakterien aus den Ordnungen Nostocales und Synechococcales durchgeführt wurden, wobei auch *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 zu letzterer Ordnung zählt (**Abb. 22**). Des Weiteren wiesen die Resultate darauf hin, dass eine hohe PHB-Bildung unter sämtlichen Mangelbedingungen erreicht werden kann, wodurch die Art des Mangels eine nachrangige Bedeutung einnimmt. Die Verbindung von Mangel und Mixotrophie begünstigte eine hohe PHB-Bildung. Dieses lässt sich auch daran erkennen, dass bei phototropher Prozessführung mit und ohne Mangel deutlich niedrigere PHB-Konzentrationen erzielt wurden. In diesem Zusammenhang war N-Mangel (Anzahl 24) die am häufigsten angewandte Strategie. Ausgehend von einem Medianwert von 11,4 % und einem Modalwert von 9,5 % kann rückgeschlossen werden, dass unter mixotropher Mangel-Kultivierung die PHB-Synthese in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA gefördert werden kann.

Die Entscheidungsbaums-Analyse unterstützt die Aussage dahingehend, dass sich Acetat als organische Substratquelle für die mixotrophe Phase bei der Ordnung Synechococcales eignet (**Abb. A 9**). Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die experimentelle Konzeption der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255.

Dabei wurde DoE eingesetzt, um den Einfluss abiotischer und biotischer Variablen auf die PHB-Bildung zu untersuchen, da dieses mit klassischen Experimentalreihen schwer realisierbar ist [193]. Die Ergebnisse ergaben, dass die höchsten PHB-Konzentrationen aus den N-Mangel vorgestressten mixotroph-kultivierten Kulturen hervorgingen (**Abb. 24**). Kein bis wenig PHB war in den anderen Kulturzuständen detektierbar (**Abb. A 5**). Die Erkenntnisse konnten durch die Modelldaten des statistischen Versuchsplans bestätigt werden (**Abb. 24**).

Die eigenen Ergebnisse stehen im Widerspruch mit den Beschreibungen von Sharma *et al.*, die mit einer Kombination aus Heterotrophie mit zusätzlicher Gas-Austausch-Limitation (GEL) bei *Nostoc muscorum* die höchsten Konzentrationen erzielten [81]. Auch Samantaray *et al.* bestätigten GEL als zielführende Strategie für *Aulosira fertilissima* und erzielten einen intrazellularen PHB-Gehalt von bis zu 48.7 % [240]. Dabei soll durch die mikroaerophile Umgebung die Aktivität des Citratzyklus, durch Entzug des terminalen Elektronenakzeptors (O₂), reduziert werden. Gebildetes und überschüssiges Acetyl-CoA würde nach dieser These zu PHB synthetisiert werden.

Die eigenen Ergebnisse widerlegen für *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 Heterotrophie und GEL als effektive PHB-Bildungsstrategie. Dieses war daraus ableitbar, dass GEL den höchsten negativen Effekt auf die PHB-Bildung aufwies (**Abb. 24**). Die Ergebnisse können damit begründet werden, dass unter phototrophen Bedingungen NADPH durch das Photosystem I gebildet wird, welches als Co-Faktor für die Reduktion von Acetoacetyl-CoA zu Hydroxybutyryl-CoA im PHB-Metabolismus notwendig ist. Ein weiterer Grund könnte die N₂-Fixierung in den Heterocysten bei *Nostoc* sp. und *Aulosira* sp. sein. Durch GEL reduziert sich ebenso die N₂-Konzentration im Medium, wodurch die Aktivität der Heterocysten verringert wird. Dieses kann in einen N-Mangel-Stress resultieren, welcher durch die geringere Löslichkeit von N₂ im Wasser (37 mg L⁻¹ bei 30 °C) weiter begünstigt wird. Dieser Zustand kann somit die PHB-Bildung der Nostoccalen Cyanobakterien fördern.

N₂-Fixierung liegt ebenfalls bei vielen Cyanobakterien auch ohne Heterocysten vor. Dieses wird durch die zirkadiane und partieller räumlicher Trennung der Photosynthese und der Stickstofffixierung bei geringem Licht- und O₂-Gehalt gesteuert [241]. Bei dem nah verwandten Organismus *Leptolyngbya boryana* wurde nicht-heterozystische N₂-Fixierung beschrieben [242]. Daher kann angenommen werden, dass *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 ebenfalls N₂ fixieren kann. Während GEL würde, demnach, im Gegensatz zu Heterocysten, die N₂-Fixierung begünstigt werden, wodurch es zu einer partiellen Aufhebung des N-Mangelzustands kommen kann. Koch *et al.* argumentierten bei Untersuchungen der PHB-Bildung in *Synechocystis* sp., dass GEL zu einer Reduktion des PHB-Pools führt, da bei photosynthetisch-aktiven *Synechocystis*-Zellen und kurzer Kultivierungszeit sich partiell O₂ im Medium anreichert. Dadurch wird zudem die Effizienz der RuBisCO bei der CO₂-Aufnahme beeinträchtigt [76]. Durch die O₂-Anreicherung im Medium würde ferner die einsetzende Photorespiration einen Kohlenstoffverlust verursachen, welcher eher zu einem PHB-Abbau als zu einem Aufbau führt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Berichten, die eine allgemein verminderte Stoffwechselaktivität unter den Bedingungen des begrenzten Gasaustauschs und schlussfolgender verringerter CO₂-Verfügbarkeit darstellten [77,243]. Die eigenen Ergebnisse zeigten einen wesentlichen, positiven Beitrag von Carbonat auf die PHB-Bildung und unterstreichen somit zuvor genannte Aussagen. Denn sowohl gelöstes CO₂ oder supplementiertes Carbonat sind für die CO₂-Fixierung durch die Umformung zu Hydrogencarbonat für den Organismus nutzbar.

In der statistischen Versuchsdurchführung wurden sowohl Acetat, Fructose und Glucose als organische Substratquellen eingesetzt. Glucose und Fructose werden durch den ED-Weg oder dem EMP-Weg metabolisiert, wobei das Reduktionsmittel NADPH gebildet wird. Dieses trifft bei der Aufnahme von Acetat nicht zu, welches durch die Acetat-Kinase unter ATP-Verbrauch zuerst zu Acetyl-CoA aktiviert werden muss [244]. Studien an mehreren *Synechocystis*-Mutanten, bei denen Schlüsselenzyme der Glucoseabbauwege ausgeschaltet wurden, zeigten, dass der ED-Weg ebenfalls physiologisch, insbesondere unter mixotrophen Bedingungen (Licht und Glucose) und unter autotrophen Bedingungen aktiv ist [26]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass unter allen untersuchten Kulturzuständen Glucose und Fructose assimiliert werden konnte.

Der Effekt von Glucose auf die PHB-Bildung war jedoch negativ. Glucose eignete sich nicht als Substrat für die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Vergleichbare Aussagen wurden von Wu *et al.* angebracht [245]. Dabei förderte Glucose zwar das Zellwachstum, begünstigten aber nicht die PHB-Synthese von *Synechocystis* PCC6803. Die Substrate Acetat und Fructose zeigten keine wesentlichen Effekte auf die PHB-Bildung. Daraus lässt sich interpretieren, dass die Substratart eine untergeordnete Rolle bei der PHB-Bildung unter mixotropher Mangelkultivierung spielte. Dieses bestätigte auch die Entscheidungsbaumanalyse, bei der sich die Substratart nicht unter den ersten fünf Entscheidungsstufen befand (**Abb. A 9**). Vielmehr war die Limitation, weiterer Mangel, die Kultivierungszeit und NaCl für eine gesteigerte PHB-Bildung von Bedeutung.

Sowohl P_i als auch N zeigten einen negativen Effekt auf die PHB-Bildung, wobei die Effektstärke von N im Vergleich zu P_i doppelt so hoch war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Abwesenheit von N einen doppelt so hohen Effekt auf die Produktion von PHB im Vergleich zu P_i hatte. Entsprechend hat sich auch die Kombination aus N- und P_i -Mangel als eine wirksame Methode zur Förderung der PHB-Bildung erwiesen. Ein Mangel an N war somit eine unverzichtbare Voraussetzung für eine erhöhte PHB-Bildung.

Die oxidativen Stressoren Ethanol und H_2O_2 zeigten keinen positiven Einfluss auf die PHB-Bildung. Es ist davon auszugehen, dass es bei der verwendeten Versuchsdurchführung zu einer für den Organismus nicht mehr tolerierbaren Toxizität kam. Ethanol und H_2O_2 wurden allerdings in Konzentrationen von 0,5 - 5 % (Ethanol) bzw. 0,5 – 5 mM (H_2O_2) in *Cuprividus necator*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* zur Erhöhung der PHB-Bildung erfolgreich eingesetzt [246–248]. Dieser Effekt konnte in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des statistischen Versuchsplan ergaben eine hohe Modellgüte. Durch die Wiederholbarkeit (W^2 0,98), die als relative Kennzahl die Reproduzierbarkeit der Versuche wiedergibt, und dem Anstieg der Auftragung der Modellwerte gegen die Beobachtungen (0,9620), war ein hoher Vertrauensbereich der Daten gegeben (**Abb. 24**). Die Ergebnisse des Screenings zeigten, dass eine mixotrophe Mangel-Kultivierung unter Acetat-Supplementation die erfolgreichste Kultivierungsstrategie zur Induktion hoher PHB-Konzentrationen darstellte.

Da als Limitation nur N-Mangel eingesetzt wurde, aber P_i -Mangel ebenfalls einen positiven Effekt auf die Bildung zeigte, fokussierte sich die anschließende Experimentalreihe auf die Untersuchung des Einflusses der Mangelarten P_i , N und NP_i . Weiterhin wurde die Glykogenbildung betrachtet, welches neben PHB als typischer Kohlenstoff- und Energiespeicher in Cyanobakterien gebildet wird [28,249].

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen bestätigten dieses für die Spezies *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Die höchste Glykogen-Konzentration bildete sich während der phototrophen N-Mangel-Phase, welche sich in der anschließenden mixotrophen Phase reduzierte. Signifikant niedrigere Glykogenkonzentrationen wurden unter P_i -Mangel und in der Kontrollkultur erreicht (**Abb. 27**). Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen N-Mangel in *Synechocystis* sp. PCC 6714 zu einer höheren Gesamtmenge an Kohlenstoff-Speicherverbindungen (PHB, Glykogen, Lipid) führte [249,250].

In der anschließenden mixotrophen Phase stieg der PHB-Gehalt in allen gestressten Kulturen an und erreichte in Abhängigkeit von der Mangel-Kultur unterschiedliche maximale Konzentrationen. Diese waren der Reihenfolge nach in der NP_i -Mangel-Kultur, gefolgt von der N-Mangel und der P_i -Mangel-Kultur am höchsten. Unter nicht bemangelten Bedingungen konnten nur sehr geringe PHB-Konzentrationen detektiert werden, wodurch die **Hypothese H2** der Notwendigkeit eines Mangels als Voraussetzung zur hohen PHB-Synthese, belegt werden konnte. Erkennbar war zudem, dass unter einen Wert von 25 mg g^{-1} (Glykogen) der PHB-Gehalt wieder abnahm. Folglich resultierte die verminderte Glykogenproduktivität während der phototrophen P_i -Mangel-Phase in einer verringerten PHB-Produktivität in der anschließenden mixotrophen Phase. Interessanterweise wurde der höchste PHB-Gehalt in der NP_i -limitierten Kultur am Tag sechs der Mixotrophie erreicht. Mit Versiegen des Glykogen-Pools baute sich der PHB-Gehalt anschließend bis zum Ende des Experimentes wieder ab. Bei der N-Mangel Kultur wurde ein intrazellulärer Glykogengehalt von 100 mg g^{-1} über den Kultivierungsverlauf nicht unterschritten, sodass bis zum Ende der Experimentalreihe die PHB-Konzentration weiter anstieg. Eine längere Kultivierungszeit hätte noch zu höheren intrazellulären Gehalten führen können.

Daraus ist erkennbar, dass die Glykogenmobilisierung mit dem PHB-Aufbau zusammenhängt, und PHB aus Glykogen gebildet wird. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Koch *et al.* [72]. Glykogensynthese-Mutanten von *Synechocystis* sp. PCC6803 produzierten weniger PHB.

Die Studie zeigte deutlich, dass PHB in glykogenproduzierenden Zellen während Stickstoffmangelperioden aus dem Glykogen-Pool produziert wurde.

Obwohl der maximale PHB-Gehalt der N-Mangel-Kultur mit 20,6 % niedriger war als der maximale in der NP_i-Mangel-Kultur (32,3 %), konnten keine signifikanten Unterschiede in der PHB-Produktivität, bezogen auf den gesamten mixotrophen Kultivierungszeitraum festgestellt werden (**Abb. 28**). Die Verwendung von N-Mangel erwies sich daher als vorteilhafter, da der größere gebildete Glykogen-Pool die Voraussetzung für eine weitere Steigerung der PHB-Bildung ermöglichen könnte. Das höhere C/N-Verhältnis der N-Mangelkultur, welches vornehmlich aus der Summe von PHB und Glykogen erklärt werden kann, unterstreicht die zuvor genannten Aussagen (**Tab. 21**). Denn hohe C/N-Verhältnisse stellen eine Voraussetzung für eine effiziente PHB-Bildung dar [251]. Demnach befand ich lediglich die N-Mangel-Kultur (C/N 13 g g⁻¹) unter N-Limitation (C/N>12.6), während sich die NP_i-Mangel-Kultur mit einem C/N von 8,6 g g⁻¹ in einem Übergangsbereich zwischen C-Mangel und N-Mangel befand (7.1<C/N<12.6) [252]. Die P_i-Mangel-Kultur (C/N 5,5) befand sich demnach unter C-Mangel, wodurch sich die geringe Biomasse- und PHB-Bildung ableiten lassen.

In der Literatur führten ähnliche mixotrophe Konzepte zu hohen PHB-Konzentrationen (**Tab. 29**). Dabei zeigte die Spezies *Synechococcus* sp. MA19 den höchsten Gehalt von 55 % unter P_i-defizienten Bedingungen. *Synechococcus* sp. MA19 ist jedoch ein extremophiles Cyanobakterium, welches Habitat-bedingt bei 50 °C kultiviert wurde. Durch den zusätzlichen Energieeinsatz, der für die Aufrechterhaltung der Temperatur notwendig ist, müssten höhere Produktionskosten investiert werden. Unter Berücksichtigung der mesophilen Kultivierungstemperatur (26 °C) ist *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 für die technische Anwendungen daher bevorteilt.

Die alleinige phototrophe Mangelkultivierung führte im Vergleich zur mixotrophen Mangelkultivierung zu einer geringeren PHB-Produktivität. Zum Ende der phototrophen Stufe nach 16 d (entspricht den Beginn der mixotrophen Phase) ergab nur die N-Mangel-Kultur einen messbaren PHB-Gehalt (2,4 %) (**Abb. 27**). Die Ergebnisse sind in Einklang mit publizierten Daten. Bei der phototrophen N-Mangel-Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6714 konnten nur 10 % PHB erreicht werden [253]. Durch UV-Licht induzierte Zufallsmutagenese erhöhte sich die PHB-Konzentration auf 37 % [213]. Die gleichzeitige Limitierung von N und P_i erwies sich bei *Synechococcus* sp. MA-19 und *Synechocystis* sp. PCC 6714 als weitere Möglichkeit einer effizienten PHB-Induktion [78,254]. In den eigenen Untersuchungen führte jedoch nur die mixotrophe Mangelkultivierung zu einer gesteigerten PHB-Bildung.

Daraus resultierte ein dreistufiger Kultivierungsprozess, in dem zuerst Biomasse bis zur stationären Phase angezogen wird, diese in der zweiten Stufe unter N-Mangel phototroph kultiviert und in der letzten Stufe durch Zugabe von Acetat die (mixotrophe-) PHB-Bildungsphase initiiert wird.

Tab. 29: Polyhydroxybutyrat-Bildung in Abhängigkeit der Mangelbedingung. Vergleich der Ergebnisse zu einer Auswahl publizierter Studien.

Spezies	Mangel	C-Quelle	Biomasse [mg L ⁻¹]	PHB [%]	Referenz
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	N, P _i	Acetat	518	32,3	Diese Arbeit
	N	Acetat	687	20,6	Diese Arbeit
	P _i	Acetat	482	7,4	Diese Arbeit
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	P _i	Acetat, Glucose	110,0	29,0	[255]
<i>Nostoc muscorum</i> Agadh	N	Acetat	465	28,0	[256]
<i>Aulosira fertilissima</i> CCC 444	N	Acetat	631	48,7	[240]
<i>Synechococcus</i> sp. MA19	P _i	-	4400	55,0	[78]
<i>Spirulina</i> sp. LEB18	N	Residual-Biomasse	500	30,7	[257]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	N, P _i	Acetat	1900	16,4	[77]

5.2.2 Biomasse- und Speicherlipidzusammensetzung

Trotz des analytischen Nachweises von PHB mittels HPLC und GC-MS lässt sich nicht ausschließen, dass *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 in der Lage ist, zusätzliche TAGs zu synthetisieren. Abgesehen von der gezielten Synthese von TAGs in molekularbiologischen modifizierten Cyanobakterien durch metabolisches Engineering [258] existieren auch vereinzelte Berichte über eine erhöhte Lipidbildung in Wildtypen wie beispielsweise in *Cyanobacterium aponium* oder *Nostoc punctiforme* [259–261]. Angesichts dessen wurden die Lipidklassen und das Fettsäureprofil (FAME) untersucht.

In den Mangelkulturen wurden TAG-Anteile von 1,3 - 1,6 % gemessen, die doppelt so hoch waren wie in der Kontrollkultur. Aufgrund des geringen intrazellulären Gehalts kann die Funktion als SL ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint die erhöhte Konzentration eine allgemeine Stressantwort auf die Umweltbedingungen zu sein, die auch bei Pflanzen auftritt. In vegetativen Pflanzenzellen erreicht TAG unter günstigen Umweltbedingungen keine hohen Konzentrationslevel [262]. Hingegen stellt die TAG-Bildung eine Antwort auf abiotischen Stress dar [263]. Abiotische Stressfaktoren beeinflussen die Zusammensetzung der Membranlipide und führen zu einer erhöhten Lipase-Aktivität. Dies kann zur Bildung von toxischen Lipidzwischenprodukten führen, die Membranschäden oder den Zelltod verursachen können. Um diese Schäden zu minimieren, werden die toxischen Metabolite durch Lipid-Körper gebunden und dadurch die toxische Wirkung reduziert [262]. Die FAME-Analyse bestätigte diese Annahme. Die Summe der C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren, die typischerweise in TAGs vorkommen, ergaben in den Kulturen unter N-Mangel, NP_i-Mangel und P_i-Mangel doppelt so hohe Werte, wie in der Kontrollkultur (**Tab. 21**). Dennoch waren diese Werte deutlich unterhalb einer Konzentration, die auf die Bildung von Lipidkörpern als Speicherlipid hindeutete. TAG-synthetisierende Mikroalgen wie *Nannochloropsis salina* oder *Chlorella sorokiniana* weisen typischerweise C₁₆- und C₁₈-Gehalte von 20 % bis 85 % vom Gesamtlipid auf [264].

Weiterhin wurde das extrahierte SL durch FTIR und GC-MS charakterisiert. Die kennzeichnenden Wellenzahlen von PHB im FTIR-Spektrum wurden durch die starke Carbonylgruppe (C=O) bei 1726 cm⁻¹ und die asymmetrische C-O-C-Streckschwingung bei 1279 cm⁻¹ bestätigt (**Abb. 29**). Diese sind typisch für Esterbindungen. Die Schwingungsmuster stimmen mit anderen Studien überein [265]. Die Adsorptionsbanden bei 1460 cm⁻¹ und 1378 cm⁻¹ sind indikativ für die -CH₂ bzw. -CH₃ Gruppen.

Der Fingerabdruckbereich von 1130 cm^{-1} bis 979 cm^{-1} wurde für C-O und C-C Streckschwingung beschrieben [73].

Durch GC-MS-Messungen konnten die Ergebnisse weiterhin verifiziert werden (**Abb. 30**). Das Monomer Valerat konnte nicht im extrahierten Polyester nachgewiesen werden. Die Massenspektren der Peaks wiesen Butyrat und Benzoesäure nach. Nicht vollständig ausgeschlossen werden kann hingegen die Bildung von Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB). P4HB ist ein Isomer von PHB, wodurch es sich nicht durch die verwendeten analytischen Methoden von PHB differenzieren lässt. Der Nachweis der molekularen Struktur von P4HB erfolgt mit Hilfe von NMR. Dabei wird die Probe in deuteriertem Chloroform gelöst und ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren aufgezeichnet [266]. PHA-Copolymere, die 4HB, wie [P(3HB-co-4HB)], enthalten, können ausschließlich aus strukturell verwandten Kohlenstoffquellen biologisch synthetisiert werden. Dazu zählen 4-Hydroxybutyrat, γ -Butyrolacton, 4-Chlorbuttersäure, 1,4-Butandiol und andere ω -Alkandiole [267]. Da keines dieser Substrate zugesetzt wurde, kann die Biosynthese von P4HB aber trotzdem ausgeschlossen werden. Das gebildete PHA in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA bestand demnach ausschließlich aus 3-Hydroxybutyrat-Monomeren (PHB).

5.2.3 Nachweis der PHB-Bildung auf molekularer und mikroskopischer Ebene

Die Produktion von PHB durch *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 wurde bislang nicht bestätigt. Um auszuschließen, dass das detektierte PHB durch eine Kontamination von anderen Bakterien verursacht wurde, erfolgte der genetische Nachweis des für das Schlüsselenzym PhaC^{III} kodierenden Genabschnitts sowie die mikroskopische Bestätigung der PHB-Granulabildung (**Abb. 26, Abb. 33**). Das ermittelte Molekulargewicht von ca. 485 bp stimmte mit den Fragmentlängen der Referenzorganismen und dem nah verwandten Organismus *Synechocystis* sp. PCC6803 (beide Synechococcales) überein (**Abb. 21 A**). Die Verwendung spezifischer Primer für *phaC*^{III} bestätigte, dass *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 genetisch zur Synthese von scl-PHA befähigt ist. Abweichend von der Literatur wurde nicht eine Kolonie-PCR, sondern das isolierte Gesamtgenom als Template für die Touchdown-PCR verwendet, was sich als effektive Methode zum Nachweis potenzieller PHB-produzierender Mikroalgen erwies. Die Primer zeigten eine hohe Spezifität für den *phaC*^{III}-Genabschnitt, was durch die klare Unterscheidung von anderen PhaC-Klassen (*phaC*^I: *C. necator*, *phaC*^{II}: *P. putida*) deutlich wurde (**Abb. 21 C**).

Überraschenderweise ließ sich jedoch auch in den beiden untersuchten Rotalgen-Isolaten ein Genabschnitt gleicher Fragmentlänge amplifizieren (**Abb. 21 B**). Obwohl Rotalgen eukaryotische Mikroalgen sind, teilen Sie Charakteristika mit Cyanobakterien, wie die Zellwandmorphologie (einfache Zellmembran) und der Bildung von Phycobilisomen. Um festzustellen, ob die Amplifikate falsch-positive Ergebnisse darstellen oder tatsächlich den PhaC^{III}-Genabschnitt im Genom amplifizierten, ist eine Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente erforderlich. Alternativ lässt sich, bei Verfügbarkeit des vollständigen Genoms, die tatsächliche Sequenzierung durch eine *in silico* PCR simulieren, wobei gleichzeitig die Basenabfolge der Fragmente bekannt und somit eine klassische Sequenzierung hinfällig wäre. Der genetische Nachweis allein reicht allerdings nicht aus, um die Aktivität des Gens zu belegen; hierfür sind weiterführende Genexpressionsanalysen auf RNA- oder Proteinebene notwendig. In keinem der untersuchten Grünalgen-Isolate ließ sich der PhaC^{III}-Genabschnitt nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu den Forschungsergebnissen von Kavitha *et al.*, Robert *et al.* und Cassusiaga *et al.*, die eine Akkumulation von PHB in den Grünalgen *Botryococcus braunii* [268] und *Chlorella* sp. [269,270] dokumentiert hatten.

5.3 Speicherlipidbestimmung in Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz

Im **Kapitel 5.1** wurde die entwickelte fluoreszenzspektroskopische Methode für die Bestimmung von PHB und Biomasse mit LG2 in *C. necator* thematisiert. Durch die Verbindung mit Modell-gestützter Analysen konnte sowohl eine präzise Bestimmung der PHB-Konzentration als auch der Biomasse erzielt werden. Zudem konnte die Methodik auf die Bestimmung von PHB (**Kapitel 4.4.1**) und Lipid/TAG in Mikroalgen (**Kapitel 4.4.3**) erfolgreich übertragen werden. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der fluorometrischen Bestimmung unter Berücksichtigung der phylogenetischen Distanzen und zellmorphologische Unterschiede (**Bezug zu Hypothese H3**) bei der PHB-Bestimmung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 (**Kapitel 5.3.1**) und der Lipid/TAG-Bestimmung in eukaryotischen Mikroalgen in (**Kapitel 5.3.2**) diskutiert.

5.3.1 Modellierung der Polyhydroxybutyrat-Konzentration in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

Die PHB-Bildung wurde durch die entwickelte LG2-Fluoreszenz-Methodik sowohl im Screening (**Kapitel 4.3.3**) als auch beim Monitoring der PHB-Bildung in Abhängigkeit der Mangelbedingungen angewandt (**Kapitel 4.3.4**).

Beim Screening wirkten sich die physiologischen Unterschiede der zwei Kulturzustände (vorgestresst; nicht vorgestresst) in Abhängigkeit mit der jeweiligen Kultivierungsstrategie (belichtet und begast; GEL) negativ auf die Korrelation der LG2-Fluoreszenz zur analytischen Referenz aus. Unter Berücksichtigung aller Messungen wurde ein R^2 von 0,63 erzielt, welches jedoch eine zu geringe Aussagekraft für eine genaue Bestimmung darstellt. Durch die Aufspaltung nach den jeweiligen Kulturen konnte für die vorgestresste und belichtete Kultur ein höherer Korrelationskoeffizient von 0,73 ermittelt werden. Die anderen Kulturen wiesen eine wesentlich geringere Streuung der PHB-Konzentrationen auf, welche in keine oder nur geringe Korrelationen resultierten. Zwar wurde mit LG2 ein Farbstoff gewählt dessen Emissionsbereich außerhalb der Emissionsbereiche intrinsischer Fluorophore (Chlorophyll, PC) liegt, jedoch scheint nicht ausgeschlossen, dass vor allem PC, welches in mehreren Kulturzuständen in variabler Intensität messbar war (**Abb. 31**), die Korrelation negativ beeinträchtigte. Denn aufgrund der Überlagerung der Emissionsbereiche von LG2 (500 nm – 560 nm) und der Absorptionsbereiche von PC (514 nm – 543 nm) kann es zu Resonanz-Energie-Transfer-Effekten zwischen den beiden Chromophoren gekommen sein [271]. Variable Konzentrationen von PHB und PC wirken daher negativ auf eine Korrelation. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Varianz von physiologischen und morphologischen Merkmalen und der Konzentration der Zielgröße (hier: PHB) eine kulturzustandsübergreifende Quantifizierung mit Fluoreszenzfarbstoffen erschwerte. Um dieses zur berücksichtigen müsste für die untersuchten Farbstoffe eine größere Datenbank an Messpunkten erstellt werden, die größere Konzentrationsbereiche der Chromophore und PHB abdeckt.

Eine alternative Methode zur Berücksichtigung intrinsischer Fluorophore wäre die Durchflusszytometrie. Hierbei wird die Fluoreszenz auf Einzelzellebene detektiert, wodurch im Gegensatz zum verwendeten Küvetten-basierten Ansatz eine schichtweise Absorption des Emissionslichts vermieden werden kann. Die Durchflusszytometrie wurde hauptsächlich zur Identifikation und Selektion von PHB-bildenden Cyanobakterien aus (Mutanten-) Bibliotheken. Aber auch vereinzelt für die Quantifizierung eingesetzt [76,160,171].

Ein anderes Bild ergab sich beim Monitoring der PHB-Konzentration bei der Untersuchung des Einflusses der Mangelbedingung unter mixotropher Prozessführung. Anders als beim Screening, in dem verschiedenste Kulturzustände vorherrschten, wurde die PHB-Bildung bei den zwei untersuchten Kulturen (N- und NP_i -Mangel) nur als Funktion der Zeit betrachtet. Zuerst wurde versucht die PHB-Konzentration über das mit *C. necator* erstellte Kalibrierungsmodell zu ermitteln. Da die Ergebnisse in einer falschen Größenordnung lagen, musste diese Herangehensweise verworfen werden. Dieses unterstützt die in den vorherigen Kapiteln gewonnene Erkenntnis, dass eine Organismen-übergreifende Übertragung von fluoreszenzspektroskopischen Modellen schwer realisierbar ist.

Dementsprechend wurden auf Basis der Datenbestände für *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 eigene Modelle entwickelt und analysiert. Höhere Korrelationen zwischen der PHB-Konzentrationen und den LG2-Fluoreszenzwerten konnten durch die Fluoreszenzintensität erzielt werden (**Tab. A 2**). Hierbei stellte sich das LR-Modell, wie bereits bei *C. necator*, als erfolgversprechend heraus. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass auch bei *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 eine lineare Beziehung zwischen dem SSC und der RF vorlag. Die Korrelation erhöhte sich, wenn die Daten aus beiden Kulturen (N, NP_i -Mangel) für die Modellbildung einbezogen wurden. Dieses war an der Darstellung der Modellergebnisse im Vergleich zu den Beobachtungen erkennbar, welche mit 1,02 sehr nahe am Optimum (1,0) lagen (**Abb. 32**). T-Test bestätigten keine signifikante Abweichung von den Referenzwerten, wodurch die Genauigkeit der Methode unterlegt werden konnte. Es war jedoch nicht möglich, die Biomasse-Konzentration durch das LR-Modell zu bestimmen, da diese während der mixotrophen Phase stagnierte. Die fehlende Variation in der Konzentration erschwerte die Modellerstellung.

5.3.2 Modellierung der Lipid/Triacylglycerol-Konzentration in eukaryotischen Mikroalgen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die für *C. necator* entwickelte fluoreszenzspektroskopische Methode mit LG2 erfolgreich auf PHB-produzierende *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 angewendet werden konnte. Die Modellierung konnte nicht über die Kalibrierungsmodelle von *C. necator* erfolgen, sodass die Daten von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 direkt für die Modellerstellung genutzt werden mussten. Folglich wurde für die Bestimmung von Lipid/TAG ebenfalls die eigenen Daten für die Modellierung verwendet. Mit *Porphyridium purpureum*, *Stichococcus* sp. WB02 und *Nannochloropsis salina* wurden drei Organismen ausgewählt, die sich laut Literaturstudien hinsichtlich ihrer phylogenetischen Abstände und Lipidmuster deutlich voneinander abheben. Diese Annahme konnte durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden (**Abb. 34 D**). Neben der unterschiedlichen Ausprägung von TAG- zur Lipid-Konzentration, konnten ebenfalls unterschiedliche Wachstumsraten detektiert werden. Die Untersuchung ergab, dass LR ein geeignetes Modell für die Bestimmung aller Zielgrößen (Biomasse, TAG-Konzentration, Lipid-Konzentration) in den eukaryotischen Mikroalgen darstellte (**Abb. 35**). Dies zeigte nicht nur den linearen Zusammenhang zwischen SSC und RF auf, sondern auch die hohe Affinität von LG2 zu PHB und Lipidkörpern. Durch die Berücksichtigung aller Daten der Organismen konnten präzise Modelle erstellt werden (**Abb. 36**). Zusätzlich erwiesen sich KNN für die Zielgrößen "Biomasse" und "Lipid" sowie SVM für die Zielgröße "Biomasse" als Modelle mit ähnlicher Genauigkeit. Da das LR-Modell für alle Zielgrößen geeignet war, wurde es als einziges weiter berücksichtigt (**Tab. 23**).

T-Tests bestätigten eine hohe Genauigkeit der Fluoreszenzdaten zur Zielgröße „TAG“ (**Tab. 24**). Es ist jedoch zu beachten, dass die Korrelationen aufgrund des stagnierenden Wachstums und der Lipidbildung von *N. salina*, negativ beeinflusst wurden. Wenn die Daten von *N. salina* ausgeschlossen werden, war die Abweichung der p-Werte zwischen den Zielgrößen "TAG" und "Lipid" sehr gering (0,01). Es ist daher schwierig zu interpretieren, ob die LG2-Fluoreszenzdaten besser mit der Zielgröße "TAG" oder "Lipid" in Zusammenhang stehen.

Die Zellwandbeschaffenheit hatte dabei keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Quantifizierung. Bei *P. purpureum* besteht der Zellwand-Zellmembran-Komplex ähnlich wie bei Cyanobakterien nur aus einer Zellmembran, während die Zellen in einer Matrix aus extrazellulären Polysacchariden eingebettet sind [144]. Über den Zellwand-Zellmembrankomplex von *Stichococcus* sp. ist nichts beschrieben. Die Grünalgen des Taxons Trebouxiophyceae, zu dem auch *Stichococcus* sp. gehört, haben eine Zellwand aus Cellulose, Algaenan und β -Galactofuranen [272]. *Nannochloropsis* sp. hingegen besitzt eine zweischichtige Zellwand mit einer cellulosehaltigen Innenwand und einer hydrophoben Außenschicht aus Algaenan [145]. Die erfolgreiche Färbung der Lipidkörper wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zudem bestätigt (**Abb. 40**).

Durch die Einlagerung der LG2-Farbstoffmoleküle in die Lipidkörper lässt sich ableiten, dass die entwickelte Methode unabhängig von der Zellwand/Zellmembran-Zusammensetzung der untersuchten Mikroalgen anwendbar war. Unter den analysierten eukaryotischen Organismen zeichnet sich *P. purpureum* durch das Vorhandensein des Phycobilins Phycoerythrin (PE) als zusätzliches Pigment im Photosynthese-Apparat aus [273]. Der Exzitationsbereich von PE reicht von 450 - 550 nm und überlappt mit dem Emissionsbereich von LG2. Jedoch wurde die Bestimmung der Zielgrößen Lipid/TAG und Biomasse nicht durch PE beeinträchtigt. Trotz N-Mangels kam es zu keinem Abbau von PE, sodass es im Modell berücksichtigt werden konnte, ohne sich negativ auf die Korrelation zur Biomasse und PHB-Konzentration auszuwirken. Im Gegensatz dazu hatten variierende Konzentrationen von PC und eine stagnierende Biomassekonzentration bei *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 einen negativen Effekt auf die jeweiligen Korrelationen (**vgl. Kapitel 4.4.1, Kapitel 5.3.1**). Da dies bei *P. purpureum* nicht der Fall war, konnte die Modellierung der Zielgrößen erfolgreich durchgeführt werden.

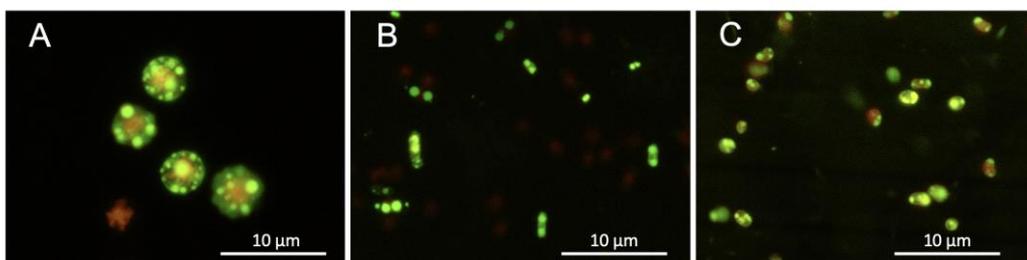


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidkörpern in *Porphyridium purpureum* (A), *Stichococcus* sp. WB02 (B) und *Nannochloropsis salina* (C). Angefärbt mit LipidGreen2.

5.4 *In situ* Differenzierung der Speicherlipidart

Unter Berücksichtigung der solvatochromen Eigenschaften von LG2 konnten *in situ* Klassifizierungsmodelle genutzt werden, um die SL-Art in Mikroalgen zu differenzieren (**Kapitel 4.5**). In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse der Häufigkeitsverteilungen der Emission in Bezug auf die SL-Arten PHB und Lipid/TAG sowie die verwendeten Modelle in Abhängigkeit der SL-Zusammensetzung diskutiert (**Bezug zu H4**).

5.4.1 Differenzierung durch das Emissionswellenlängen-Maximum

Aufgrund der verschiedenen molekularen Strukturen von TAG und PHB ist anzunehmen, dass die Hydrophobizitäten von LG2 in den PHB-Carbonosomen und Lipidkörpern unterschiedlich sind. Dieses sollte durch die verschiedenen Verschiebungen in den Emissionswellenlängen belegbar sein. Die Analyse der Häufigkeit der Emissionswellenlängenmaxima von LG2 ergab jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Speicherlipidarten PHB und Lipid/TAG (**Abb. 37, Abb. 38**).

Unter der Annahme, dass eine Zunahme der Hydrophobizität zu einer hypsochromen Verschiebung des Emissionswellenlängenmaximums führen sollte, wäre zu erwarten, dass bei Organismen, die Lipid/TAG akkumulieren, aufgrund ihrer deutlich höheren molekularen Hydrophobizität, niedrigere Emissionswellenlängen ergeben als bei PHB-produzierenden Organismen (**Tab. 30**). Allerdings spiegelt die Differenz der beiden kürzesten ermittelten Wellenlängen aus beiden Speicherlipidarten dieses nicht wider (**Tab. 25**).

Hierbei wurden die minimalen Emissionswellenlängenmaxima bei *C. necator* (PHB, Stickstoffmangel, 509 nm) und bei *Stichococcus* sp. (Lipid/TAG, 506 nm) festgestellt. Dies ließ sich ebenfalls durch die Verteilungshäufigkeit der Emissionswellenlängen erkennen, die sich untereinander nicht wesentlich unterschieden. Folglich wird die Verschiebung des Emissionswellenlängenmaximums hauptsächlich durch die Menge an SL und die Konzentration des Farbstoffs bestimmt, und nicht durch die SL-Art. Diese Feststellung gilt sowohl für die zusammengeführten Datensätze unter Berücksichtigung aller Organismen des jeweiligen Speicherlipids als auch für die Unterteilung der Datensätze in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der SL-Bildung in den jeweiligen Organismen bestätigten dieses ebenfalls. Die *C. necator*-Kultur unter P_i-Mangel wies die niedrigste PHB-Produktivität auf und hatte zudem das längste Häufigkeitsmaximum im Vergleich zu den anderen Kulturen (N-Mangel, NaCl-Stress) (vgl. **Abb. 20**). Eine ähnliche Situation ergab sich bei dem Verhältnis vom TAG- zum Gesamtlipidgehalt. *P. purpureum* und *Stichococcus* sp. wiesen trotz des unterschiedlichen Anteils sehr ähnliche Emissionswellenlängenmaxima von 517 nm (*P. purpureum*) bzw. 512 nm (*Stichococcus* sp.) auf (**Abb. 34**). Hingegen resultierte das Emissionswellenlängenhäufigkeitsmaximum von *N. salina* (542 nm), welches die geringsten Lipid-Konzentrationen bei sehr hohem TAG-Anteil aufwies, im langwelligsten Emissionswellenlängenmaximum. Daraus lässt sich schließen, dass die Hydrophobizität der Umgebung nicht der alleinige Grund für die Emissionswellenlänge ist. Vielmehr ist die Emissionsverschiebung eher als eine Funktion der SL-Konzentration zu verstehen, basierend auf den Daten.

Tab. 30: Molekulare Eigenschaften von ausgewählten theoretischen Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) und Triacylglycerole (TAGs). logP: Hydrophobizitätsindex, logP/M: molekulare Hydrophobizität, PHB: Polyhydroxybutyrat, PHBHV: Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat). Daten berechnet mit Chems sketch.

Klasse	Substanz	logP	M [g mol ⁻¹]	logP/M
TAGs	Triacylglycerol 12:0-16:0-18:1	10,56	777,3	13,59
	Triacylglycerol 14:0-16:1-18:3	10,49	799,3	13,12
	Triacylglycerol 16:1-18:1-18:1	10,71	857,4	12,49
	Triacylglycerol 18:0-18:0-18:0	10,86	891,5	12,18
PHAs	PHB Decamer	1,82	862,9	2,11
	PHBHV Decamer (33% HV)	3,33	905,0	3,68
	PHBHV Decamer (50% HV)	4,33	933,1	4,64

Die eigenen Untersuchungsergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den Resultaten von Zuriani *et al.* und Wu *et al.*, die eine Abnahme der Wellenlänge um 10 bis 25 nm in Abhängigkeit vom PHA-Typ aufzeigten [104,219]. Diaz *et al.* haben eine Unterscheidung zwischen polaren und unpolaren Lipiden mit NR vorgenommen [139]. Es ergab sich jedoch, dass die Verkürzung der Emissionswellenlänge nicht aussagekräftig genug war, um auf Basis der vorliegenden Daten eine Differenzierung zwischen PHB und Lipid/TAG mit der LG2-Fluoreszenz zu belegen.

5.4.2 Differenzierung durch Modell-gestützte Analysen

Neben der Analyse der diskreten Verteilung der Emissionswellenlängenhäufigkeiten zur Differenzierung wurden auch modellbasierte Klassifizierungsmethoden angewendet. Diese Methoden berücksichtigten die Fluoreszenzintensität der eingelagerten Farbstoffmoleküle in PHA-Carbonosomen bzw. Lipidkörpern (gemessen am Emissionswellenlängenmaximum), die Intensität der Moleküle im polaren Umfeld (gemessen bei 560 nm) sowie die Verschiebung der Emissionswellenlängen zwischen diesen beiden Intensitäten. Bei der Auswertung der Grenzwertoptimierung (ROC) zeigte sich, dass die Klassifikationsmodelle KNN und SVM am besten für eine Differenzierung der SL-Typen geeignet waren, da diese die größten Flächen unter der Kurve (AUC) aufwiesen (**Abb. 39**). Die Analyse mittels der Konfusionsmatrix bestätigte für die Zielgröße PHB eine Prognosegenauigkeit von 89 % (KNN) beziehungsweise 87 % (SVM). KNN erzielte für die Zielgröße Lipid/TAG mit 87 % eine ähnliche Vorhersagepräzision wie für die Zielgröße PHB. Mit SVM konnte eine 95 %ige Genauigkeit für die Zielgröße Lipid/TAG ermittelt werden, jedoch eine geringe für PHB. Daraus lässt sich ableiten, dass zur Unterscheidung des Speicherlipidtyps KNN zu bevorzugen ist, da die Fehlklassifikation für beide Zielkategorien vergleichbar ausfiel. Die modellbasierte Klassifizierung stellt gegenüber der Analyse der Emissionswellenlängen-Maxima (**vgl. Kapitel 5.4.1**) einen signifikanten Vorteil dar. Durch die Einbeziehung von drei spektralen Parametern und der Berücksichtigung der Organismen als kategoriale Variable, war es trotz der hohen Varianz in Art, Menge und Zusammensetzung der SL möglich, eine präzise Klassifizierung vorzunehmen. Die hohe Spezifität der Modelle zeigte sich darin, dass die Daten den jeweiligen Organismen wieder zugeordnet werden konnten. Somit erwies sich der Ansatz der fluoreszenzspektroskopischen Klassifizierung ebenfalls als vielversprechend für die Unterscheidung von verschiedenen Mikroalgen-Organismen (**Tab. A 3**). Wie auch bei der Bestimmung der SL-Menge könnte ein größerer Datensatz (hier: 46 Datenpunkte) eine höhere Klassifizierungsgenauigkeit ergeben. Eine Klassifizierung von Mikroalgen durch Fluoreszenzmessungen wurde beispielsweise mittels Durchflusszytometrie beschrieben. Dabei konnten Mischproben aus drei Organismen durch die Erfassung der Chlorophyllfluoreszenz und des Widerstandsimpulssensors differenziert werden [274,275]. Die in dieser Arbeit präsentierte Methode hingegen basiert allein auf den spektralen Daten der Emissionsscans und unterscheidet sich damit deutlich von den zuvor genannten Studien.

6 Zusammenfassung und Fazit

In den folgenden Kapiteln werden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit nochmals zusammengefasst und mit den zu Beginn aufgestellten Hypothesen und Forschungsfragen (**Kapitel 2**) bewertet.

6.1 Effekt der molekularen Eigenschaften und Einfluss abiotischer und biotischer Faktoren auf die LipidGreen2-Fluoreszenz

Die physikochemische Analyse von LipidGreen2 (LG2) hat bestätigt, dass der Farbstoff für die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung und Visualisierung von Polyhydroxybutyrat (PHB) in *C. necator* geeignet ist. Der Farbstoff zeichnete sich durch eine hohe Molekülstabilität (**Abb. 13**) und eine Quantenausbeute aus, die mit Nile red (NR) vergleichbar war (**Abb. 12**). Durch die Kombination der positiven Eigenschaften von BODIPY^{493/503} (spektraler Bereich) und NR (Solvatochromie) kann LG2 gezielt zur *in situ*-Markierung von PHB-Granula eingesetzt werden. Der Färbeprozess wurde dabei von biotischen und abiotischen Faktoren beeinflusst, wobei die Farbstoff- und Biomassekonzentration den größten Effekt auf die Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität aufwiesen (**Abb. 14**). Die Reduktion der Inkubationszeit ging mit Erhöhung der Farbstoffkonzentration und des Carrier-Solvents einher.

Der Effekt der Biomasse konnte durch Einbeziehung des Seitwärtsstreulichtes (SSC) in die Berechnung der Speicherlipid (SL)- Konzentration berücksichtigt werden. Hierbei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem SSC und der LG2-Fluoreszenz festgestellt (**Abb. 16**). Durch Integration des SSC-Wertes konnte die Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit gewährleistet werden (**Abb. 18**). Die Beziehung von SSC und LG2-Fluoreszenz konnte ferner durch das Modell der linearen Regression (LR) dargestellt, welches zuverlässig für die Bestimmung der PHB-Konzentration und der Biomasse in *C. necator* verwendet werden konnte (**Abb. 20**).

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Parameter und Eigenschaften, die in **Hypothese H1** dargelegt wurden, eine ausschlaggebende Rolle bei der Anwendung spielten. Durch eine Anpassung des Färbeprotokolls und dem Einbezug des SSCs bei der PHB-Bestimmung konnte ein reproduzierbarer Färbeprozess und Messmethodik entwickelt werden.

6.2 Wirkung biotischer und abiotischer Faktoren auf die Polyhydroxybutyrat-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255

Bei dem PHB-Bildungsprozess spielten sowohl abiotische als auch biotische Einflussgrößen eine Rolle. Der Kulturzustand als biotische Variable hatte den höchsten Einfluss (**Abb. 24**). Eine Limitation war ausschlaggebend für eine gesteigerte PHB-Bildung (**Abb. 25**). Dabei katalysierte mixotrophe Mangelkultivierung den PHB-Bildungsprozess. Das Substrat spielte eine untergeordnete Rolle. Gasaustauschlimitation (GEL) zeigte keinen positiven Effekt auf die PHB-Bildung. Kein signifikanter Unterschied in der Bildungsrate konnte zwischen N-Mangel und NP_i -Mangel festgestellt werden (**Abb. 28**). Jedoch wirkte P_i -Mangel negativ auf die Biomassebildung. Die PHB-Bildung korrelierte mit dem Abbau von Glykogen, wobei unter phototrophen N-Mangel die höchste Glykogenkonzentration und C/N-Verhältnis gebildet wurde (**Abb. 27, Tab. 21**). Unter Berücksichtigung der höheren Biomassebildung unter N-Mangel ergab sich eine mehrstufige skalierbare Kultivierungsstrategie bestehend aus Biomasse-Anzucht (phototrophe Phase), Stressinduktion (phototrophe N-Mangelphase) und PHB-Bildungsphase (mixotrophe Mangelkultivierung). Die Parameter für eine geeignete Kultivierungsstrategie für die PHB-Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 konnten evaluiert werden. Die PHB-Bildung wurde maßgeblich unter mixotropher N-Mangelkultivierung katalysiert. Die **Hypothese H2** konnte somit angenommen werden.

6.3 Einfluss phylogenetischer Distanzen und Morphologie auf die Speicherlipid-Bestimmung in Mikroalgen durch LipidGreen2-Fluoreszenz

Phylogenetische Distanzen, Unterschiede in der Zellwand/Zellmembran-Zusammensetzung und die SL-Art der untersuchten Mikroalgen beeinträchtigten nicht die Anwendung der fluorometrischen SL-Bestimmung und Visualisierung mit LG2 (**Abb. 33, Abb. 40**). Ein linearer Zusammenhang aus SSC und der Fluoreszenz (RF) konnte bei allen untersuchten Organismen unabhängig vom SL-Typ und SL-Menge festgestellt werden (**Abb. 32, Abb. 36**). Dieses führte zu LR-Modellen mit hoher Genauigkeit. (**Abb. 32, Abb. 35**). Signifikanztestes bestätigten die Genauigkeit der durch die Modelle ermittelten SL-Konzentrationen (**Tab. 22, Tab. 24**).

Darüber hinaus war es möglich, die Biomasse durch den SCC zu bestimmen. Die Nutzung von eigenen Kalibrierdaten für jeden Organismus, genauso wie nicht-stagnierende Datensätze waren jedoch eine Voraussetzung für eine hohe Korrelation zu der jeweiligen Zielgröße.

Die vorliegenden Resultate gehen nicht mit **Hypothese H3** einher. Es konnte gezeigt werden, dass weder die untersuchte SL-Art, die Zusammensetzung noch die Zellmorphologie einen Einfluss auf die Anwendbarkeit der Fluoreszenzmethode hatten.

6.4 Differenzierung der Speicherlipidart in Abhängigkeit der Zusammensetzung

Die SL-Art und Zusammensetzung variierte in den untersuchten Mikroalgen und konnte durch LG2-Fluoreszenz *in situ* differenziert werden. Mit künstlichem neuronalen Netzwerken (KNN) und Support Vector Machines (SVM) wurden Klassifizierungsmodelle genutzt, die unabhängig vom Organismus, die SL-Art und der Konzentration eine hohe Vorhersagegenauigkeit für PHB und Lipid/TAG aufwiesen (**Tab. 27**). Das Emissionswellenlängenmaximum war dabei als Kriterium nicht aussagekräftig genug, da die Emissionswellenlängenhäufigkeitsverteilung maßgeblich von der SL-Konzentration und nicht von der SL-Art bedingt war (**Abb. 37, Abb. 38**). Dahingehend war die Berücksichtigung der Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffmoleküle in hydrophober (PHB-Granulum bzw. Lipidkörper) und polarer Umgebung (Farbstoffmoleküle außerhalb der Zelle) sowie der Wellenlängenverschiebung zwischen beiden Intensitäten die Voraussetzung für die erfolgreiche Differenzierung (**Abb. 39, Tab. 27**).

Basierend auf den Ergebnissen konnte die **Hypothese H4** geprüft werden. Eine Differenzierung der SL-Art war auf Basis der LG2-Fluoreszenzdaten möglich.

6.5 Fazit

Das Fazit dieser Studie bestätigt die Schlüsselannahmen, die im Zusammenhang mit der Kultivierung und der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung der untersuchten SL stehen.

In Bezug auf die Kultivierung von *Leptolyngbya* sp. zur PHB-Produktion konnte die Hypothese **H2** angenommen werden. N-Mangel erwies sich als essentielle Voraussetzung für eine gesteigerte PHB-Produktivität. Mixotrophe Mangelkultivierung förderte dabei den PHB-Bildungsprozess. Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer mehrstufigen Kultivierungsstrategie. Dies ermöglicht wiederum eine gezielte Steuerung der Biomasseproduktion und der PHB-Bildung.

Im Bereich der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung von PHB und TAG konnten die Hypothesen **H1** und **H4** angenommen werden. Die Anpassung des Färbeprotokolls unter Berücksichtigung biotischer und abiotischer Einflussgrößen in Kombination mit Modellgestützter Korrelationsanalysen waren die Voraussetzung für eine erfolgreiche Quantifizierung sowie Differenzierung der untersuchten Speicherlipidarten PHB und TAG mittels LipidGreen2-Fluoreszenz. Phylogenetische Distanzen und zellmorphologische Unterschiede wiesen dabei keinen Einfluss auf die Anwendbarkeit der Methode an den untersuchten Mikroalgen auf (**H3**). Damit erwies sich die entwickelte Gesamtmethodik als spezifisch, selektiv und übertragbar.

Ein entscheidender Vorteil der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung ist der deutlich geringere Zeitaufwand im Vergleich zu instrumenteller Analytik wie HPLC. Während die Fluoreszenzmessungen ab Probenahme nur 6-7 min dauern, benötigt die HPLC-Analyse 2-3 h ohne Berücksichtigung der Probentrocknung. Dieses Zeitersparnis macht die fluoreszenzspektroskopische Methode effizienter und kostengünstiger für die Untersuchung der PHB- und TAG-Bildung in Mikroorganismen.

7 Ausblick

Aus dieser Arbeit ging hervor, dass sowohl biotische als auch abiotische Faktoren auf den PHB-Bildungsprozess in Cyanobakterien einwirkten. Das Verständnis des Prozesses der SL-Bildung in Mikroalgen ist von großem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. Dieses lässt sich damit begründen, dass Mikroalgen unter phototrophen Bedingungen CO₂ fixieren und im Vergleich zur Kultivierung ölhaltiger Pflanzen keine Konkurrenz um landwirtschaftliche Nutzflächen darstellen. Die Mikroalgenbiotechnologie kann somit einen wichtigen Beitrag zur Transformation zu einer bioökonomischen und nachhaltigen Gesellschaft leisten. Die erzielten Ergebnisse können dazu beitragen, den Kultivierungsprozess wirtschaftlicher zu gestalten.

Es wurde gezeigt, dass für eine effektive Produktion von PHB mit *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 eine mehrstufige Kultivierungsstrategie notwendig ist. Folgende Experimente könnten sich daher mit der Optimierung der Übergänge zwischen den Kultivierungsphasen beschäftigen, um eine höhere Biomasse- und PHB-Bildung zu erzielen. Als Kriterium könnte der intrazelluläre Glykogen-Gehalt oder das C/N-Verhältnis berücksichtigt werden. Die Notwendigkeit eines mehrstufigen Kultivierungsprozesses bietet andererseits die Möglichkeit, effizientere Kultivierungsstrategien in die Mikroalgenbiotechnologie einzuführen, wie z.B. die kontinuierliche Fermentation. Durch die räumliche Trennung der Kultivierungsphasen kann eine höhere volumetrische Produktausbeute gewährleistet werden, welche mit einer Verringerung der Produktionskosten einhergeht.

Die Anwendung von DoE hat sich als effektive Methode zur Identifizierung von Einflussfaktoren erwiesen und kann daher bei ähnlichen Fragestellungen Berücksichtigung finden. Zum Beispiel könnten zukünftige Experimente sich auf die Analyse von Faktoren konzentrieren, die die Bildung von TAG oder anderen kommerziell erhältlichen Produkten wie Phycocyanin oder Astaxanthin in Mikroalgen beeinflussen, um Upstream-Prozesse effizienter zu gestalten. DoE hat sich zudem auch als geeignete Methode zur Parameteroptimierung von chemisch-biologischen Prozessen erwiesen. In dieser Arbeit wurde DoE erfolgreich eingesetzt, um die Färbebedingungen bei der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung zu analysieren und zu optimieren.

Die Nutzung von DoE bei der Optimierung von Downstream-Prozessen, wie die der Extraktion der intrazellulären Produkte PHB oder TAG, könnte dazu beitragen, den gesamten Produktionsprozess rentabler zu gestalten und gleichzeitig Ressourcen und Zeit zu sparen.

Die Analyse der Fluoreszenz-Färbebedingungen und der Korrelationsmodelle hat zum Verständnis der Beziehung zwischen der Fluoreszenz und der SL-Konzentration beigetragen. Durch die Berücksichtigung des SSC bei der Berechnung der SL-Konzentration durch Fluoreszenz konnte nicht nur eine signifikante lineare Korrelation festgestellt, sondern auch der SSC direkt zur Bestimmung der Biomasse verwendet werden. Dieses Prinzip kann daher auch auf weitere Organismen übertragen werden. Um den Zusammenhang genauer zu untersuchen und gegebenenfalls für jeden Organismus zu optimieren, könnten nachfolgende Experimente durchgeführt werden, die die Untersuchung von SSC-Werten unterschiedlicher Wellenlängen in Abhängigkeit des Organismus und des Produktes einschließen. Eine geeignete Fluoreszenzmethode für dieses Vorhaben wäre die 3D-Exzitation-Emission-Messung, da durch die höhere Datenauflösung mehr Informationen extrahiert und für Korrelationsstudien genutzt werden können.

Durch den Einsatz von Modell-gestützten Analysen konnte zudem die Wiedergabegenauigkeit der Messdaten erhöht und die Datenverarbeitung erleichtert werden. Durch größere Datenbanken könnte die Prognosegenauigkeit für Regressions- und Klassifizierungsmodelle weiter verbessert werden. Dadurch könnten Modelle mit hoher Spezifität entwickelt werden, die morphologische Änderungen während des SL-Bildungsprozesses besser berücksichtigen.

Die Kombination von Fluoreszenzdaten und modellgestützter Datenverarbeitung bildet die Grundlage für die Entwicklung eines Softsensors im Rahmen der Prozessanalysetechnologie. Dieser Softsensor wäre somit in der Lage, simultan mehrere Zielgrößen zu bestimmen und zu prognostizieren. Diese Methode bietet eine Alternative zu durchflusszytometrischen Verfahren aufgrund ihrer höheren Informationsdichte. Mit minimalem Automatisierungsaufwand und der Verwendung einer Durchflusszellenküvette könnte ein dezentrales und gleichzeitig vielfältiges Monitoring von Zielgrößen erreicht werden.

8 Referenzen

1. US EPA. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2019 | US EPA. Available online: <https://www.epa.gov/ghgemissions/inventory-us-greenhouse-gas-emissions-and-sinks-1990-2019> (accessed on 15 August 2021).
2. Geyer, R.; Jambeck, J.R.; Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* **2017**, *3*, e1700782, doi:10.1126/sciadv.1700782.
3. Griehl, C.; Bieler, S. Algen: Rohstoffe für Gesundheit, Schönheit und Energie. *Nachr. Chem.* **2011**, *59*, 942–947, doi:10.1515/NACHRCHEM.2011.59.10.942.
4. Shaikh, R.; Rizvi, A.; Pandit, S.; Desai, N.; Patil, R. Microalgae: Classification, bioactives, medicinal properties, industrial applications, and future prospectives. *An Integration of Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment*; Elsevier, 2022; pp 451–486, ISBN 9780128234990.
5. Guiry, M.D. & Guiry, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available online: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=38330.
6. Liu, B.; Benning, C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr Opin Biotechnol* **2013**, *24*, 300–309, doi:10.1016/j.copbio.2012.08.008.
7. Wilkinson, J.F. The Problem of Energy-Storage Compounds in Bacteria. *Exp. Cell. Res.* **1959**, *7*, 111–130.
8. Alishah Aratboni, H.; Rafiei, N.; Garcia-Granados, R.; Alemzadeh, A.; Morones-Ramírez, J.R. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb Cell Fact* **2019**, *18*, 178, doi:10.1186/s12934-019-1228-4.
9. Athenstaedt, K.; Daum, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 1355–1369, doi:10.1007/s00018-006-6016-8.
10. Garay, L.A.; Boundy-Mills, K.L.; German, J.B. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives: A mechanistic approach and future perspectives. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 2709–2727, doi:10.1021/jf4042134.

11. Rueda, E.; García-Galán, M.J.; Díez-Montero, R.; Vila, J.; Grifoll, M.; García, J. Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. *Bioresour Technol* **2020**, *295*, 122233, doi:10.1016/j.biortech.2019.122233.
12. Philippis, R. de; Sili, C.; Vincenzini, M. Glycogen and poly- -hydroxybutyrate synthesis in *Spirulina maxima*. *J. Gen. Microbiol.* **1992**, *138*, 1623–1628, doi:10.1099/00221287-138-8-1623.
13. Sattley, W.M.; Madigan, M.T. Microbiology. In *Encyclopedia of life sciences*; John Wiley & Sons, L., Ed.; Wiley: Chichester, 2005; pp 1–10, ISBN 9780470016176.
14. Hu, J.; Nagarajan, D.; Zhang, Q.; Chang, J.-S.; Lee, D.-J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnol Adv* **2018**, *36*, 54–67, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.009.
15. Ruiz, J.; Wijffels, R.H.; Dominguez, M.; Barbosa, M.J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. *Algal Res* **2022**, *64*, 102698, doi:10.1016/j.algal.2022.102698.
16. Singh, P.; Kumari, S.; Guldhe, A.; Misra, R.; Rawat, I.; Bux, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Ren. Sust. En. Rev.* **2016**, *55*, 1–16, doi:10.1016/j.rser.2015.11.001.
17. Aziz, M.M.A.; Kassim, K.A.; Shokravi, Z.; Jakarni, F.M.; Liu, H.Y.; Zaini, N.; Tan, L.S.; Islam, A.S.; Shokravi, H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Ren. Sust. En. Rev.* **2020**, *119*, 109621, doi:10.1016/j.rser.2019.109621.
18. Perez-Garcia, O.; Bashan, Y. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In *Algal Biorefineries*; Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 61–131, ISBN 978-3-319-20199-3.
19. Sun, X.-M.; Ren, L.-J.; Zhao, Q.-Y.; Ji, X.-J.; Huang, H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol Biofuels* **2018**, *11*, 272, doi:10.1186/s13068-018-1275-9.
20. Li, G.; Xiao, W.; Yang, T.; Lyu, T. Optimization and Process Effect for Microalgae Carbon Dioxide Fixation Technology Applications Based on Carbon Capture: A Comprehensive Review. *C (Basel)* **2023**, *9*, 35, doi:10.3390/c9010035.

21. Patil, P.P.; Vass, I.; Kodru, S.; Szabó, M. A multi-parametric screening platform for photosynthetic trait characterization of microalgae and cyanobacteria under inorganic carbon limitation. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0236188, doi:10.1371/journal.pone.0236188.
22. Pancha, I.; Chokshi, K.; Ghosh, T.; Paliwal, C.; Maurya, R.; Mishra, S. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol* **2015**, *193*, 315–323, doi:10.1016/j.biortech.2015.06.107.
23. Gardner, R.D.; Lohman, E.; Gerlach, R.; Cooksey, K.E.; Peyton, B.M. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 87–96, doi:10.1002/bit.24592.
24. Sajjadi, B.; Chen, W.-Y.; Raman, A.A.A.; Ibrahim, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2018**, *97*, 200–232, doi:10.1016/j.rser.2018.07.050.
25. Chang, W.; Li, Y.; Qu, Y.; Liu, Y.; Zhang, G.; Zhao, Y.; Liu, S. Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the biomass and lipid production with synergistic effect of red light and phytohormone IAA. *Renew. Energy* **2022**, *187*, 819–828, doi:10.1016/j.renene.2022.01.108.
26. Chen, X.; Schreiber, K.; Appel, J.; Makowka, A.; Fährnich, B.; Roettger, M.; Hajirezaei, M.R.; Sönnichsen, F.D.; Schönheit, P.; Martin, W.F.; et al. The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, 5441–5446, doi:10.1073/pnas.1521916113.
27. Tan, K.W.M.; Lin, H.; Shen, H.; Lee, Y.K. Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 37235, doi:10.1038/srep37235.
28. Doello, S.; Klotz, A.; Makowka, A.; Gutekunst, K.; Forchhammer, K. A Specific Glycogen Mobilization Strategy Enables Rapid Awakening of Dormant Cyanobacteria from Chlorosis. *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 594–603, doi:10.1104/pp.18.00297.
29. Damrow, R.; Maldener, I.; Zilliges, Y. The Multiple Functions of Common Microbial Carbon Polymers, Glycogen and PHB, during Stress Responses in the Non-Diazotrophic *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 966, doi:10.3389/fmicb.2016.00966.

30. Yang, L.; Chen, J.; Qin, S.; Zeng, M.; Jiang, Y.; Hu, L.; Xiao, P.; Hao, W.; Hu, Z.; Lei, A.; et al. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 40, doi:10.1186/s13068-018-1041-z.
31. Chapman, K.D.; Dyer, J.M.; Mullen, R.T. Commentary: why don't plant leaves get fat? *Plant Sci.* **2013**, *207*, 128–134, doi:10.1016/j.plantsci.2013.03.003.
32. Markou, G.; Vandamme, D.; Muylaert, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Res* **2014**, *65*, 186–202, doi:10.1016/j.watres.2014.07.025.
33. Zienkiewicz, A.; Zienkiewicz, K.; Poliner, E.; Pulman, J.A.; Du, Z.-Y.; Stefano, G.; Tsai, C.-H.; Horn, P.; Feussner, I.; Farre, E.M.; et al. The Microalga *Nannochloropsis* during Transition from Quiescence to Autotrophy in Response to Nitrogen Availability. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 819–839, doi:10.1104/pp.19.00854.
34. Satpati, G.G.; Gorain, P.C.; Pal, R. Efficacy of EDTA and Phosphorous on Biomass Yield and Total Lipid Accumulation in Two Green Microalgae with Special Emphasis on Neutral Lipid Detection by Flow Cytometry. *Adv. Biol.* **2016**, *2016*, 1–12, doi:10.1155/2016/8712470.
35. Roopnarain, A.; Gray, V.M.; Sym, S.D. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresour Technol* **2014**, *156*, 408–411, doi:10.1016/j.biortech.2014.01.092.
36. Song, X.; Liu, B.-F.; Kong, F.; Ren, N.-Q.; Ren, H.-Y. Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. *Resour. Conserv. Recycl.* **2022**, *183*, 106355, doi:10.1016/j.resconrec.2022.106355.
37. Ermis, H.; Guven-Gulhan, U.; Cakir, T.; Altinbas, M. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. *Sci Rep* **2020**, *10*, 3510, doi:10.1038/s41598-020-60622-1.
38. Chowdury, K.H.; Nahar, N.; Deb, U.K. The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *CWEEE* **2020**, *09*, 185–215, doi:10.4236/cweee.2020.94012.
39. Gorain, P.C.; Bagchi, S.K.; Mallick, N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environ. Technol.* **2013**, *34*, 1887–1894, doi:10.1080/09593330.2013.812668.

40. Li, X.; Hu, H.; Zhang, Y. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour Technol* **2011**, *102*, 3098–3102, doi:10.1016/j.biortech.2010.10.055.
41. Xia, L.; Rong, J.; Yang, H.; He, Q.; Zhang, D.; Hu, C. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. *Bioresour Technol* **2014**, *161*, 402–409, doi:10.1016/j.biortech.2014.03.063.
42. Satpati, G.G.; Chandra Gorain, P.; Paul, I.; Pal, R. An integrated salinity-driven workflow for rapid lipid enhancement in green microalgae for biodiesel application. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 112340–112355, doi:10.1039/C6RA23933A.
43. Passanha, P.; Kedia, G.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J.; Esteves, S.R. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* **2014**, *163*, 287–294, doi:10.1016/j.biortech.2014.04.068.
44. Gill, S.S.; Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **2010**, *48*, 909–930, doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
45. Yilancioglu, K.; Cokol, M.; Pastirmaci, I.; Erman, B.; Cetiner, S. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e91957, doi:10.1371/journal.pone.0091957.
46. Henderson, R.A.; Jones, C.W. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Arch Microbiol* **1997**, *168*, 486–492, doi:10.1007/s002030050526.
47. Ulery, B.D.; Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys* **2011**, *49*, 832–864, doi:10.1002/polb.22259.
48. Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 5–21, doi:10.1016/S0169-409X(01)00218-6.
49. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503–1555, doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
50. Ben Abdallah, M.; Karray, F.; Sayadi, S. Production of Polyhydroxyalkanoates by Two Halophilic Archaeal Isolates from Chott El Jerid Using Inexpensive Carbon Sources. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10010109.

51. Mudliar, S.N.; Vaidya, A.N.; Suresh Kumar, M.; Dahikar, S.; Chakrabarti, T. Techno-economic evaluation of PHB production from activated sludge. *Clean Technol. Environ. Policy* **2008**, *10*, 255–262, doi:10.1007/s10098-007-0100-0.
52. McAdam, B.; Brennan Fournet, M.; McDonald, P.; Mojicevic, M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/polym12122908.
53. Numata, K.; Morisaki, K.; Tomizawa, S.; Ohtani, M.; Demura, T.; Miyazaki, M.; Nogi, Y.; Deguchi, S.; Doi, Y. Synthesis of poly- and oligo(hydroxyalkanoate)s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polym. J.* **2013**, *45*, 1094–1100, doi:10.1038/pj.2013.25.
54. Mezzolla, V.; D'Urso, O.F.; Poltronieri, P. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers (Basel)* **2018**, *10*, doi:10.3390/polym10080910.
55. Chek, M.F.; Kim, S.-Y.; Mori, T.; Arsad, H.; Samian, M.R.; Sudesh, K.; Hakoshima, T. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5312, doi:10.1038/s41598-017-05509-4.
56. Stubbe, J.; Tian, J.; He, A.; Sinskey, A.J.; Lawrence, A.G.; Liu, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 433–480, doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133013.
57. Sagong, H.-Y.; Son, H.F.; Choi, S.Y.; Lee, S.Y.; Kim, K.-J. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 790–805, doi:10.1016/j.tibs.2018.08.005.
58. Wang, Q.; Yu, H.; Xia, Y.; Kang, Z.; Qi, Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 47, doi:10.1186/1475-2859-8-47.
59. Shen, R.; Ning, Z.-Y.; Lan, Y.-X.; Chen, J.-C.; Chen, G.-Q. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. *Metab Eng* **2019**, *54*, 117–126, doi:10.1016/j.ymben.2019.03.011.
60. Bresan, S.; Sznajder, A.; Hauf, W.; Forchhammer, K.; Pfeiffer, D.; Jendrossek, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26612, doi:10.1038/srep26612.

61. Jendrossek, D.; Pfeiffer, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* **2014**, *16*, 2357–2373, doi:10.1111/1462-2920.12356.
62. NOVA-Institute. Bio-based Building Blocks and Polymers: Glpbal Capacities, Production and Trends 2018-2023 **2019**.
63. Pavan, F.A.; Junqueira, T.L.; Watanabe, M.D.; Bonomi, A.; Quines, L.K.; Schmidell, W.; Aragao, G.M. de. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery. *Biochem. Eng. J.* **2019**, *146*, 97–104, doi:10.1016/j.bej.2019.03.009.
64. New Media Publisher GmbH, Kaarst. Rohstoffe & Preise. Available online: https://plasticker.de/preise/preise_monat_single.php (accessed on 31 May 2023).
65. Chen, G.-Q. Industrial Production of PHA. In ; pp 121–132.
66. Sohn, Y.J.; Son, J.; Jo, S.Y.; Park, S.Y.; Yoo, J. in; Baritugo, K.-A.; Na, J.G.; Choi, J.; Kim, H.T.; Joo, J.C.; et al. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review. *Bioresour Technol* **2021**, *340*, 125693, doi:10.1016/j.biortech.2021.125693.
67. Le Zhang; Jiang, Z.; Tsui, T.-H.; Loh, K.-C.; Dai, Y.; Tong, Y.W. A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 946085, doi:10.3389/fbioe.2022.946085.
68. Bernstein, H.C.; McClure, R.S.; Hill, E.A.; Markillie, L.M.; Chrisler, W.B.; Romine, M.F.; McDermott, J.E.; Posewitz, M.C.; Bryant, D.A.; Konopka, A.E.; et al. Unlocking the Constraints of Cyanobacterial Productivity: Acclimations Enabling Ultrafast Growth. *MBio* **2016**, *7*, doi:10.1128/mBio.00949-16.
69. Koller, M. Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoate Production: Status Quo and Quo Vadis? *Curr Biotechnol* **2016**, *4*, 464–480, doi:10.2174/2211550104666150917010849.
70. Silvestrini, L.; Drosig, B. Identification of Four Polyhydroxyalkanoate Structural Genes in *Synechocystis cf. salina* PCC6909: *In silico* Evidences. *J Proteomics Bioinform* **2016**, *09*, doi:10.4172/jpb.1000386.
71. Hauf, W.; Watzer, B.; Roos, N.; Klotz, A.; Forchhammer, K. Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81*, 4411–4422, doi:10.1128/AEM.00604-15.

72. Koch, M.; Doello, S.; Gutekunst, K.; Forchhammer, K. PHB is Produced from Glycogen Turn-over during Nitrogen Starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20081942.
73. Ansari, S.; Fatma, T. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0158168, doi:10.1371/journal.pone.0158168.
74. Koch, M.; Forchhammer, K. Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. *Microb. Physiol.* **2021**, *31*, 67–77, doi:10.1159/000515617.
75. Klotz, A.; Georg, J.; Bučinská, L.; Watanabe, S.; Reimann, V.; Januszewski, W.; Sobotka, R.; Jendrossek, D.; Hess, W.R.; Forchhammer, K. Awakening of a Dormant Cyanobacterium from Nitrogen Chlorosis Reveals a Genetically Determined Program. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 2862–2872, doi:10.1016/j.cub.2016.08.054.
76. Koch, M.; Berendzen, K.W.; Forchhammer, A.K. On the Role and Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Life (Basel)* **2020**, *10*, doi:10.3390/life10040047.
77. Kamravamanesh, D.; Pflügl, S.; Nischkauer, W.; Limbeck, A.; Lackner, M.; Herwig, C. Photosynthetic poly- β -hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB Express* **2017**, *7*, 143, doi:10.1186/s13568-017-0443-9.
78. Nishioka, M.; Nakai, K.; Miyake, M.; Asada, Y.; Taya, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1095–1099, doi:10.1023/A:1010551614648.
79. Shrivastav, A.; Mishra, S.K.; Mishra, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46*, 255–260, doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001.
80. Samantaray, S.; Mallick, N. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by the diazotrophic cyanobacterium *Aulosira fertilissima* CCC 444. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 237–245, doi:10.1007/s10811-013-0073-9.
81. Sharma, L.; Mallick, N. Enhancement of poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* under mixotrophy, chemoheterotrophy and limitations of gas-exchange. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 59–62, doi:10.1007/s10529-004-6586-1.

82. Komarek, J.; Kastovsky, J.; Mares, J.; Johansen, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* **214**, 86, 295–335.
83. Anagnostidis, K.; J. Komárek. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 3 - Oscillatoriales **1988**.
84. Roja, K.; Ruben Sudhakar, D.; Anto, S.; Mathimani, T. Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, 22, 101358, doi:10.1016/j.bcab.2019.101358.
85. Singh, P.; Kumar, D. Biomass and Lipid Productivities of Cyanobacteria- *Leptolyngbya foveolarum* HNBGU001. *Bioenerg Res* **2021**, 14, 278–291, doi:10.1007/s12155-020-10170-3.
86. Tiwari, O.N.; Bhunia, B.; Bandyopadhyay, T.K.; Oinam, G. Strategies for improved induction of lipid in *Leptolyngbya* sp. BTA 287 for biodiesel production. *Fuel (Lond)* **2019**, 256, 115896, doi:10.1016/j.fuel.2019.115896.
87. Cagliari, A.; Margis, R.; Dos Santos Maraschin, F.; Turchetto-Zolet, A.C.; Loss, G.; Margis-Pinheiro, M. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in Plants and algae. *Int J Plant Biol* **2011**, 2, e10, doi:10.4081/pb.2011.e10.
88. Danielewicz, M.A.; Anderson, L.A.; Franz, A.K. Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry. *J Lipid Res* **2011**, 52, 2101–2108, doi:10.1194/jlr.D018408.
89. Enamala, M.K.; Enamala, S.; Chavali, M.; Donepudi, J.; Yadavalli, R.; Kolapalli, B.; Aradhyula, T.V.; Velpuri, J.; Kuppam, C. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2018**, 94, 49–68, doi:10.1016/j.rser.2018.05.012.
90. Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **2008**, 54, 621–639, doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
91. Goold, H.; Beisson, F.; Peltier, G.; Li-Beisson, Y. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep.* **2015**, 34, 545–555, doi:10.1007/s00299-014-1711-7.

92. Vieler, A.; Brubaker, S.B.; Vick, B.; Benning, C. A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1562–1569, doi:10.1104/pp.111.193029.
93. Moellering, E.R.; Benning, C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **2010**, *9*, 97–106, doi:10.1128/ec.00203-09.
94. Yang, L.; Ding, Y.; Chen, Y.; Zhang, S.; Huo, C.; Wang, Y.; Yu, J.; Zhang, P.; Na, H.; Zhang, H.; et al. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* **2012**, *53*, 1245–1253, doi:10.1194/jlr.R024117.
95. Wältermann, M.; Steinbüchel, A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3607–3619, doi:10.1128/JB.187.11.3607-3619.2005.
96. Mao, X.; Wu, T.; Kou, Y.; Shi, Y.; Zhang, Y.; Liu, J. Characterization of type I and type II diacylglycerol acyltransferases from the emerging model alga *Chlorella zofingiensis* reveals their functional complementarity and engineering potential. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 28, doi:10.1186/s13068-019-1366-2.
97. Pal, P.; Chew, K.W.; Yen, H.-W.; Lim, J.W.; Lam, M.K.; Show, P.L. Cultivation of Oily Microalgae for the Production of Third-Generation Biofuels. *Sustainability* **2019**, *11*, 5424, doi:10.3390/su11195424.
98. Sivakumar, G.; Jeong, K.; Lay, J.O. Bioprocessing of *Stichococcus bacillaris* strain siva2011. *Biotechnol Biofuels* **2014**, *7*, 62, doi:10.1186/1754-6834-7-62.
99. Ma, X.-N.; Chen, T.-P.; Yang, B.; Liu, J.; Chen, F. Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Mar Drugs* **2016**, *14*, doi:10.3390/md14040061.
100. Oh, S.H.; Han, J.G.; Kim, Y.; Ha, J.H.; Kim, S.S.; Jeong, M.H.; Jeong, H.S.; Kim, N.Y.; Cho, J.S.; Yoon, W.B.; et al. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *J Biosci Bioeng* **2009**, *108*, 429–434, doi:10.1016/j.jbiosc.2009.05.020.
101. Reddy, A.R.; Kumar, R.B.; Prabhakar, K.V. Isolation and Identification of PolyHydroxyButyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample. *Res. J. Pharm. Technol.* **2017**, *10*, 1065, doi:10.5958/0974-360X.2017.00193.7.
102. Mesquita, D.P.; Amaral, A.L.; Leal, C.; Oehmen, A.; Reis, M.A.M.; Ferreira, E.C. Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image

- analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Anal Chim Acta* **2015**, *865*, 8–15, doi:10.1016/j.aca.2015.01.018.
103. Greenspan, P.; Mayer, E.P.; Fowler, S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 965–973, doi:10.1083/jcb.100.3.965.
104. Zuriani, R.; Vigneswari, S.; Azizan, M.N.M.; Majid, M.I.A.; Amirul, A.A. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18*, 472–478, doi:10.1007/s12257-012-0607-z.
105. Brennan, L.; Blanco Fernández, A.; Mostaert, A.S.; Owende, P. Enhancement of BODIPY505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *J Microbiol Methods* **2012**, *90*, 137–143, doi:10.1016/j.mimet.2012.03.020.
106. Lane, C.E.; Benton, M.G. Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, phaC, in cyanobacteria via colony PCR. *Mol. Cell. Probes* **2015**, *29*, 454–460, doi:10.1016/j.mcp.2015.07.001.
107. LAW, J.H.; SLEPECKY, R.A. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **1961**, *82*, 33–36, doi:10.1128/jb.82.1.33-36.1961.
108. Szewczyk, E.; Mikucki, J. Poly-beta-hydroxybutyric acid in *staphylococci*. *FEMS Microbiol Lett* **1989**, *61*, 279–284, doi:10.1111/j.1574-6968.1989.tb03637.x.
109. Karr, D.B.; Waters, J.K.; Emerich, D.W. Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. *Appl Environ Microbiol* **1983**, *46*, 1339-1244.
110. Duvigneau, S.; Kettner, A.; Carius, L.; Griehl, C.; Findeisen, R.; Kienle, A. Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Appl Microbiol Biotechnol* **2021**, *105*, 4743–4749, doi:10.1007/s00253-021-11265-3.
111. Ackermann, J.-U.; Babel, W. Growth-associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. *Appl Microbiol Biotechnol* **1997**, *47*, 144–149, doi:10.1007/s002530050903.
112. Riis, V.; Mai, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric propanolysis. *J Chromatogr* **1988**, *445*, 285–289.

113. Tan, G.-Y.A.; Chen, C.-L.; Ge, L.; Li, L.; Wang, L.; Zhao, L.; Mo, Y.; Tan, S.N.; Wang, J.-Y. Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis. *J Biosci Bioeng* **2014**, *117*, 379–382, doi:10.1016/j.jbiosc.2013.08.020.
114. Satoh, H.; Sakamoto, T.; Kuroki, Y.; Kudo, Y.; Mino, T. Application of the Alkaline-Digestion-HPLC Method to the Rapid Determination of Polyhydroxyalkanoate in Activated Sludge. *J. Water Environ. Technol.* **2016**, *14*, 411–421, doi:10.2965/jwet.16-027.
115. Pati, S.; Maity, S.; Dash, A.; Jema, S.; Mohapatra, S.; Das, S.; Samantaray, D.P. Biocompatible PHB Production from *Bacillus* Species Under Submerged and Solid-State Fermentation and Extraction Through Different Downstream Processing. *Curr Microbiol* **2020**, *77*, 1203–1209, doi:10.1007/s00284-020-01922-7.
116. Kansiz, M.; Billman-Jacobe, H.; McNaughton, D. Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3415–3420, doi:10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000.
117. Dean, A.P.; Sigeo, D.C.; Estrada, B.; Pittman, J.K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol* **2010**, *101*, 4499–4507, doi:10.1016/j.biortech.2010.01.065.
118. Mishra, S.K.; Suh, W.I.; Farooq, W.; Moon, M.; Shrivastav, A.; Park, M.S.; Yang, J.-W. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol* **2014**, *155*, 330–333, doi:10.1016/j.biortech.2013.12.077.
119. Boussiba, S.; Vonshak, A.; Cohen, Z.; Avissar, Y.; Richmond, A. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* **1987**, *12*, 37–47, doi:10.1016/0144-4565(87)90006-0.
120. Olsson, P.; Holmbäck, J.; Herslöf, B. Separation of lipid classes by HPLC on a cyanopropyl column. *Lipids* **2012**, *47*, 93–99, doi:10.1007/s11745-011-3627-0.
121. Shapaval, V.; Brandenburg, J.; Blomqvist, J.; Tafintseva, V.; Passoth, V.; Sandgren, M.; Kohler, A. Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 140, doi:10.1186/s13068-019-1481-0.

122. Bigelow, N.W.; Hardin, W.R.; Barker, J.P.; Ryken, S.A.; Macrae, A.C.; Cattolico, R.A. A Comprehensive GC-MS Sub-Microscale Assay for Fatty Acids and its Applications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1329–1338, doi:10.1007/s11746-011-1799-7.
123. Ami, D.; Posterl, R.; Mereghetti, P.; Porro, D.; Doglia, S.M.; Branduardi, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 12, doi:10.1186/1754-6834-7-12.
124. Tan, G.-Y.; Chen, C.-L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I.; Li, Y.; Zhao, L.; Mo, Y.; Wang, J.-Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers (Basel)* **2014**, *6*, 706–754, doi:10.3390/polym6030706.
125. Alemán-Nava, G.S.; Cuellar-Bermudez, S.P.; Cuaresma, M.; Bosma, R.; Muylaert, K.; Ritmann, B.E.; Parra, R. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *J Microbiol Methods* **2016**, *128*, 74–79, doi:10.1016/j.mimet.2016.07.011.
126. Elsey, D.; Jameson, D.; Raleigh, B.; Cooney, M.J. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J Microbiol Methods* **2007**, *68*, 639–642, doi:10.1016/j.mimet.2006.11.008.
127. Jaeger, D.; Pilger, C.; Hachmeister, H.; Oberländer, E.; Wördenweber, R.; Wichmann, J.; Mussnug, J.H.; Huser, T.; Kruse, O. Label-free in vivo analysis of intracellular lipid droplets in the oleaginous microalga *Monoraphidium neglectum* by coherent Raman scattering microscopy. *Sci Rep* **2016**, *6*, 35340, doi:10.1038/srep35340.
128. Cirulis, J.T.; Strasser, B.C.; Scott, J.A.; Ross, G.M. Optimization of staining conditions for microalgae with three lipophilic dyes to reduce precipitation and fluorescence variability. *Cytometry A* **2012**, *81*, 618–626, doi:10.1002/cyto.a.22066.
129. Spiekermann, P.; Rehm, B.H.; Kalscheuer, R.; Baumeister, D.; Steinbüchel, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 73–80, doi:10.1007/s002030050681.
130. Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006, ISBN 0387312781.
131. Klymchenko, A.S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res* **2017**, *50*, 366–375, doi:10.1021/acs.accounts.6b00517.

132. Vuppaladadiyam, A.K.; Prinsen, P.; Raheem, A.; Luque, R.; Zhao, M. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* **2018**, *12*, 304–324, doi:10.1002/bbb.1864.
133. Rumin, J.; Bonnefond, H.; Saint-Jean, B.; Rouxel, C.; Sciandra, A.; Bernard, O.; Cadoret, J.-P.; Bougaran, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 42, doi:10.1186/s13068-015-0220-4.
134. Tseng, H.-W.; Shen, J.-Y.; Kuo, T.-Y.; Tu, T.-S.; Chen, Y.-A.; Demchenko, A.P.; Chou, P.-T. Excited-state intramolecular proton-transfer reaction demonstrating anti-Kasha behavior. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 655–665, doi:10.1039/c5sc01945a.
135. Zhao, Y.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets. *Chem Commun (Camb)* **2022**, *58*, 1495–1509, doi:10.1039/d1cc05717k.
136. Greenspan, P.; Fowler, S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 781–789.
137. Gorenflo, V.; Steinbüchel, A.; Marose, S.; Rieseberg, M.; Scheper, T. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl Microbiol Biotechnol* **1999**, *51*, 765–772, doi:10.1007/s002530051460.
138. Yablon, D.G.; Schilowitz, A.M. Solvatochromism of Nile Red in nonpolar solvents. *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58*, 843–847, doi:10.1366/0003702041389328.
139. Diaz, G.; Melis, M.; Batetta, B.; Angius, F.; Falchi, A.M. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* **2008**, *39*, 819–824, doi:10.1016/j.micron.2008.01.001.
140. Collot, M.; Fam, T.K.; Ashokkumar, P.; Faklaris, O.; Galli, T.; Danglot, L.; Klymchenko, A.S. Ultrabright and Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging and Tracking of Lipid Droplets in Cells and Tissues. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5401–5411, doi:10.1021/jacs.7b12817.
141. Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G.; Luo, F.-T.; Green, S.A.; Liu, H. Highly water-soluble neutral BODIPY dyes with controllable fluorescence quantum yields. *Org Lett* **2011**, *13*, 438–441, doi:10.1021/ol102758z.
142. Brown, B.; Immethun, C.; Wilkins, M.; Saha, R. Rhodospseudomonas palustris CGA009 polyhydroxybutyrate production from a lignin aromatic and quantification via flow cytometry. *Bioresour. Technol. Rep.* **2020**, *11*, 100474, doi:10.1016/j.biteb.2020.100474.

143. Klymchenko, A.S.; Roger, E.; Anton, N.; Anton, H.; Shulov, I.; Vermot, J.; Mely, Y.; Vandamme, T.F. Highly lipophilic fluorescent dyes in nano-emulsions: towards bright non-leaking nano-droplets: Towards bright non-leaking nano-droplets. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 11876–11886, doi:10.1039/C2RA21544F.
144. Hawkins, E.K.; Lee, J.J. Fine Structure of the Cell Surface of a Cultured Endosymbiont Strain of *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *Trans. Am. Microsc. Soc.* **1990**, *109*, 352, doi:10.2307/3226689.
145. Scholz, M.J.; Weiss, T.L.; Jinkerson, R.E.; Jing, J.; Roth, R.; Goodenough, U.; Posewitz, M.C.; Gerken, H.G. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell* **2014**, *13*, 1450–1464, doi:10.1128/EC.00183-14.
146. Choi, J.E.; Na, H.Y.; Yang, T.H.; Rhee, S.-K.; Song, J.K. A lipophilic fluorescent LipidGreen1-based quantification method for high-throughput screening analysis of intracellular poly-3-hydroxybutyrate. *AMB Express* **2015**, *5*, 131, doi:10.1186/s13568-015-0131-6.
147. Lee, J.H.; So, J.-H.; Jeon, J.H.; Choi, E.B.; Lee, Y.-R.; Chang, Y.-T.; Kim, C.-H.; Bae, M.A.; Ahn, J.H. Synthesis of a new fluorescent small molecule probe and its use for in vivo lipid imaging. *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47*, 7500–7502, doi:10.1039/c1cc11253h.
148. Chun, H.-S.; Jeon, J.H.; Pagire, H.S.; Lee, J.H.; Chung, H.-C.; Park, M.J.; So, J.-H.; Ryu, J.-H.; Kim, C.-H.; Ahn, J.H.; et al. Synthesis of LipidGreen2 and its application in lipid and fatty liver imaging. *Mol Biosyst* **2013**, *9*, 630–633, doi:10.1039/c3mb70022d.
149. Wu, S.; Zhang, B.; Huang, A.; Huan, L.; He, L.; Lin, A.; Niu, J.; Wang, G. Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricorutum* using Nile red and BODIPY 505/515. *J Appl Phycol* **2014**, *26*, 1659–1668, doi:10.1007/s10811-013-0223-0.
150. La Hoz Siegler, H. de; Ayidzoe, W.; Ben-Zvi, A.; Burrell, R.E.; McCaffrey, W.C. Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. *Algal Res.* **2012**, *1*, 176–184, doi:10.1016/j.algal.2012.07.004.
151. Velmurugan, N.; Sung, M.; Yim, S.S.; Park, M.S.; Yang, J.W.; Jeong, K.J. Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. *Bioresour Technol* **2013**, *138*, 30–37, doi:10.1016/j.biortech.2013.03.078.

152. Vigeolas, H.; Duby, F.; Kaymak, E.; Niessen, G.; Motte, P.; Franck, F.; Remacle, C. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 3–12, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.017.
153. Manandhar-Shrestha, K.; Hildebrand, M. Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a *Chlorella* sp. microalga. *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 1643–1651, doi:10.1007/s10811-013-0021-8.
154. Govender, T.; Ramanna, L.; Rawat, I.; Bux, F. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresour Technol* **2012**, *114*, 507–511, doi:10.1016/j.biortech.2012.03.024.
155. Guzmán, H.M.; La Jara Valido, A. de; Duarte, L.C.; Presmanes, K.F. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquacult Int* **2010**, *18*, 189–199, doi:10.1007/s10499-008-9235-1.
156. Ren, H.-Y.; Liu, B.-F.; Kong, F.; Zhao, L.; Ren, N.-Q. Improved Nile red staining of *Scenedesmus* sp. by combining ultrasonic treatment and three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Algal Res.* **2015**, *7*, 11–15, doi:10.1016/j.algal.2014.11.007.
157. Wong, D.M.; Nguyen, T.T.; Franz, A.K. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) enhances intracellular lipid staining with Nile red in microalgae *Tetraselmis suecica*. *Algal Res.* **2014**, *5*, 158–163, doi:10.1016/j.algal.2014.08.002.
158. Montero, M.F.; Aristizábal, M.; García Reina, G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 1053–1057, doi:10.1007/s10811-010-9623-6.
159. Hong, K.; Beld, J.; Davis, T.D.; Burkart, M.D.; Palenik, B. Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria. *J. Phycol.* **2021**, *57*, 754–765, doi:10.1111/jpy.13123.
160. Tyo, K.E.; Zhou, H.; Stephanopoulos, G.N. High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72*, 3412–3417, doi:10.1128/AEM.72.5.3412-3417.2006.

161. Schlebusch, M.; Forchhammer, K. Requirement of the nitrogen starvation-induced protein Sll0783 for polyhydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* **2010**, *76*, 6101–6107, doi:10.1128/AEM.00484-10.
162. Roleda, M.Y.; Slocombe, S.P.; Leakey, R.J.G.; Day, J.G.; Bell, E.M.; Stanley, M.S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour Technol* **2013**, *129*, 439–449, doi:10.1016/j.biortech.2012.11.043.
163. Encarnaç o, T.; Arranja, C.T.; Cova, T.F.G.G.; Pais, A.A.C.C.; Campos, M.G.; Sobral, A.J.F.N.; Burrows, H.D. Monitoring oil production for biobased feedstock in the microalga *Nannochloropsis* sp.: a novel method combining the BODIPY BD-C12 fluorescent probe and simple image processing. *J Appl Phycol* **2018**, *30*, 2273–2285, doi:10.1007/s10811-018-1437-y.
164. Simionato, D.; Sforza, E.; Corteggiani Carpinelli, E.; Bertucco, A.; Giacometti, G.M.; Morosinotto, T. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: effects on lipids accumulation. *Bioresour Technol* **2011**, *102*, 6026–6032, doi:10.1016/j.biortech.2011.02.100.
165. Doan, T.-T.Y.; Obbard, J.P. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 895–901, doi:10.1007/s10811-010-9608-5.
166. Resch-Genger, U.; Hoffmann, K.; Nietfeld, W.; Engel, A.; Neukammer, J.; Nitschke, R.; Ebert, B.; Macdonald, R. How to improve quality assurance in fluorometry: fluorescence-inherent sources of error and suited fluorescence standards. *J Fluoresc* **2005**, *15*, 337–362, doi:10.1007/s10895-005-2630-3.
167. Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: From single molecules to ensembles*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011, ISBN 3527316698.
168. Panigrahi, S.K.; Mishra, A.K. Study on the dependence of fluorescence intensity on optical density of solutions: the use of fluorescence observation field for inner filter effect corrections. *Photochem. Photobiol.* **2019**, *18*, 583–591, doi:10.1039/c8pp00498f.
169. Chen, W.; Zhang, C.; Song, L.; Sommerfeld, M.; Hu, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J Microbiol Methods* **2009**, *77*, 41–47, doi:10.1016/j.mimet.2009.01.001.

170. Isleten-Hosoglu, M.; Gultepe, I.; Elibol, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *61*, 11–19, doi:10.1016/j.bej.2011.12.001.
171. Karmann, S.; Follonier, S.; Bassas-Galia, M.; Panke, S.; Zinn, M. Robust at-line quantification of poly(3-hydroxyalkanoate) biosynthesis by flow cytometry using a BODIPY 493/503-SYTO 62 double-staining. *J Microbiol Methods* **2016**, *131*, 166–171, doi:10.1016/j.mimet.2016.10.003.
172. Cooper, M.S.; Hardin, W.R.; Petersen, T.W.; Cattolico, R.A. Visualizing "green oil" in live algal cells. *J Biosci Bioeng* **2010**, *109*, 198–201, doi:10.1016/j.jbiosc.2009.08.004.
173. A. Gusbeth, C.; Eing, C.; Göttel, M.; Sträßner, R.; Frey, W. Fluorescence Diagnostics for Lipid Status Monitoring of Microalgae during Cultivation. *IJREB* **2016**, 1–10, doi:10.5171/2016.899698.
174. Huang, G.-H.; Chen, G.; Chen, F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass Bioenergy* **2009**, *33*, 1386–1392, doi:10.1016/j.biombioe.2009.05.022.
175. Cooksey, K.E.; Guckert, J.B.; Williams, S.A.; Callis, P.R. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J Microbiol Methods* **1987**, *6*, 333–345, doi:10.1016/0167-7012(87)90019-4.
176. Pick, U.; Rachutin-Zalogin, T. Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *J Microbiol Methods* **2012**, *88*, 189–196, doi:10.1016/j.mimet.2011.10.008.
177. Yang, H. *Data science, AI, and machine learning in drug development*, First edition; CRC Press: Boca Raton, 2023, ISBN 0367708078.
178. Kashyap, Vinay. *Data Science Workflow: From Research Experiments to Business Use-Cases*. Available online: <https://hevodata.com/learn/data-science-workflows/>.
179. Ethiraj, S. A review on data science in biotechnology. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2017**, *8*.
180. Xcelpros. *Key Applications of Data Science in the Biotechnology Industry*. Available online: <https://xcelpros.com/key-applications-of-data-science-in-the-biotechnology-industry/> (accessed on 3 February 2023).

181. Dr. Cher Han Lau. 5 Steps of a Data Science Project Lifecycle - Towards Data Science. *Towards Data Science [Online]*, March 1, 2019. Available online: <https://towardsdatascience.com/5-steps-of-a-data-science-project-lifecycle-26c50372b492> (accessed on 31 May 2023).
182. Ahn, E.; Kang, H. Introduction to systematic review and meta-analysis. *Korean J. Anesthesiol.* **2018**, *71*, 103–112, doi:10.4097/kjae.2018.71.2.103.
183. Uman, L.S. Systematic reviews and meta-analyses. *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2011**, *20*, 57–59.
184. Ravanipour, M.; Hamidi, A.; Mahvi, A.H. Microalgae biodiesel: A systematic review in Iran. *Ren. Sust. En. Rev.* **2021**, *150*, 111426, doi:10.1016/j.rser.2021.111426.
185. Ortiz-Martínez, V.M.; Andreo-Martínez, P.; García-Martínez, N.; Pérez de los Ríos, A.; Hernández-Fernández, F.J.; Quesada-Medina, J. Approach to biodiesel production from microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method. *Fuel Process. Technol.* **2019**, *191*, 211–222, doi:10.1016/j.fuproc.2019.03.031.
186. Czitrom, V. One-Factor-at-a-Time versus Designed Experiments. *Am. Stat.* **1999**, *53*, 126, doi:10.2307/2685731.
187. Selvamuthu, D.; Das, D. *Introduction to Statistical Methods, Design of Experiments and Statistical Quality Control*; Springer Singapore; Imprint: Springer: Singapore, 2018, ISBN 978-981-13-1736-1.
188. Carrascal, L.M.; Galván, I.; Gordo, O. Partial least squares regression as an alternative to current regression methods used in ecology. *Oikos* **2009**, *118*, 681–690, doi:10.1111/j.1600-0706.2008.16881.x.
189. Lawson, C.E.; Martí, J.M.; Radivojevic, T.; Jonnalagadda, S.V.R.; Gentz, R.; Hillson, N.J.; Peisert, S.; Kim, J.; Simmons, B.A.; Petzold, C.J.; et al. Machine learning for metabolic engineering: A review. *Metab Eng* **2021**, *63*, 34–60, doi:10.1016/j.ymben.2020.10.005.
190. Xu, P.; Rizzoni, E.A.; Sul, S.-Y.; Stephanopoulos, G. Improving Metabolic Pathway Efficiency by Statistical Model-Based Multivariate Regulatory Metabolic Engineering. *ACS Synth Biol* **2017**, *6*, 148–158, doi:10.1021/acssynbio.6b00187.
191. Govindarajan, S.; Mannervik, B.; Silverman, J.A.; Wright, K.; Regitsky, D.; Hegazy, U.; Purcell, T.J.; Welch, M.; Minshull, J.; Gustafsson, C. Mapping of amino acid substitutions conferring herbicide resistance in wheat glutathione transferase. *ACS Synth Biol* **2015**, *4*, 221–227, doi:10.1021/sb500242x.

192. Venkata Mohan, S.; Venkateswar Reddy, M. Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental methodology. *Bioresour Technol* **2013**, *128*, 409–416, doi:10.1016/j.biortech.2012.10.037.
193. Azubuike, C.C.; Edwards, M.G.; Gatehouse, A.M.R.; Howard, T.P. Applying Statistical Design of Experiments To Understanding the Effect of Growth Medium Components on *Cupriavidus necator* H16 Growth. *Appl Environ Microbiol* **2020**, *86*, doi:10.1128/AEM.00705-20.
194. Morris, M. *Design of experiments: An introduction based on linear models*; Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, 2011, ISBN 9781439894903.
195. Liu, J.-Y.; Zeng, L.-H.; Ren, Z.-H.; Du, T.-M.; Liu, X. *Rapid in situ measurements of algal cell concentrations using an artificial neural network and single-excitation fluorescence spectrometry*; Elsevier B.V, 2020. *Algal Res.*, *45*.
196. Byvatov, E.; Schneider, G. Support vector machine applications in bioinformatics. *Appl. Bioinformatics* **2003**, *2*, 67–77.
197. Calders, T.; Verwer, S. Three naive Bayes approaches for discrimination-free classification. *Data Min. Knowl. Discov.* **2010**, *21*, 277–292, doi:10.1007/s10618-010-0190-x.
198. Demsar, J.; Curk, T.; Erjavec, A.; Gorup, C.; Hocevar, T.; Milutinovic, M.; Mozina, M.; Polajnar, M.; Toplak, M.; Staric, A.; et al. Orange: Data Mining Toolbox in Python. *Journal of Machine Learning Research* **2013**, *14*, 2349–2353.
199. Alpaydin, E. *Introduction to machine learning*, 3. ed.; The MIT Press: Cambridge, 2014, ISBN 978-0-262-02818-9.
200. BISHOP, C.M. *Pattern recognition and machine learning*; Springer: New York, 2006, ISBN 0-387-31073-8.
201. Duvigneau, S.; Dürr, R.; Behrens, J.; Kienle, A. Advanced Kinetic Modeling of Bio-copolymer Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production Using Fructose and Propionate as Carbon Sources. *Processes (Basel)* **2021**, *9*, 1260, doi:10.3390/pr9081260.
202. Novak, M. Mathematical Modelling as a Tool for Optimized PHA Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2015**, *29*, 183–220, doi:10.15255/CABEQ.2014.2101.
203. Carpine, R.; Olivieri, G.; Hellingwerf, K.; Pollio, A. The Cyanobacterial Route to Produce Poly- β -hydroxybutyrate. *Chem. Eng. Trans.* **2015**, *43*, 289–294, doi:10.3303/CET1543049.

204. The Cyanobacterial Route to Produce Poly- β -hydroxybutyrate. The Cyanobacterial Route to Produce Poly- β -hydroxybutyrate.
205. Béchet, Q.; Shilton, A.; Guieysse, B. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol Adv* **2013**, *31*, 1648–1663, doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.014.
206. Ryu, H.W.; Hahn, S.K.; Chang, Y.K.; Chang, H.N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 28–32, doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<28:AID-BIT4>3.3.CO;2-7.
207. Kimm, S.B.; Lee, S.C.; Lee, S.Y.; Chang, H.N.; Chang, Y.K.; Woo, S.I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *43*, 892–898.
208. NORCCA. *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Available online: <https://niva-cca.no/shop/cyanophyceae/leptolyngbya/niva-cya-255> (accessed on 8 April 2021).
209. Stanier, R. Y.; Deruelles, J.; Rippka, R.; Herdman, M.; Waterbury, J.B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology* **1979**, *111*, 1–61, doi:10.1099/00221287-111-1-1.
210. Georg-August-Universität Göttingen. List of Media and Recipes - Georg-August-Universität Göttingen. Available online: <https://www.uni-goettingen.de/de/list-of-media-and-recipes/186449.html> (accessed on 4 February 2023).
211. Safi, C.; Charton, M.; Pignolet, O.; Silvestre, F.; Vaca-Garcia, C.; Pontalier, P.-Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 523–529, doi:10.1007/s10811-012-9886-1.
212. Forchhammer, K.; Tandeau de Marsac, N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 2033–2040, doi:10.1128/jb.177.8.2033-2040.1995.
213. Kamravamanesh, D.; Slouka, C.; Limbeck, A.; Lackner, M.; Herwig, C. Increased carbohydrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain *Synechocystis* sp. PCC 6714: Bioprocess understanding and evaluation of productivities. *Bioresour. Technol.* **2019**, *273*, 277–287, doi:10.1016/j.biortech.2018.11.025.

214. Sander, T.; Freyss, J.; Korff, M. von; Rufener, C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 460–473, doi:10.1021/ci500588j.
215. Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Veij, M. de; Félix, E.; Magariños, M.P.; Mosquera, J.F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D930-D940, doi:10.1093/nar/gky1075.
216. Guex, N.; Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714–2723.
217. Ghoneim, N. Photophysics of Nile red in solution. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2000**, *56*, 1003–1010, doi:10.1016/S1386-1425(99)00199-7.
218. Sitepu, I.R.; Ignatia, L.; Franz, A.K.; Wong, D.M.; Faulina, S.A.; Tsui, M.; Kanti, A.; Boundy-Mills, K. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J Microbiol Methods* **2012**, *91*, 321–328, doi:10.1016/j.mimet.2012.09.001.
219. Wu, H.-A.; Sheu, D.-S.; Lee, C.-Y. Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *J Microbiol Methods* **2003**, *53*, 131–135, doi:10.1016/s0167-7012(02)00232-4.
220. Merckmillipore. Nilrot Sigma-Aldrich. Available online: https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/n3013?gclid=EAIaIQobChMIpvzOv_7J9QIVj7t3Ch3kbgXZEAAYASAAEgJhWfD_BwE (accessed on 31 January 2022).
221. Merckmillipore. LipidGreen2 - MERCK. Available online: https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/LipidGreen2-Calbiochem,EMD_BIO-506029 (accessed on 31 January 2022).
222. Ray, A.; Das, S.; Chattopadhyay, N. Aggregation of Nile Red in Water: Prevention through Encapsulation in β -Cyclodextrin. *ACS Omega* **2019**, *4*, 15–24, doi:10.1021/acsomega.8b02503.
223. Danylchuk, D.I.; Moon, S.; Xu, K.; Klymchenko, A.S. Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-resolution Imaging of Plasma Membrane Organization. *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 15062–15066, doi:10.1002/ange.201907690.
224. Beatriz, A. A Review of the Synthetic Strategies for the Development of BODIPY Dyes for Conjugation with Proteins. *orbital* **2013**, *5*, doi:10.17807/orbital.v5i1.482.

225. Balduyck, L.; Veryser, C.; Goiris, K.; Bruneel, C.; Muylaert, K.; Foubert, I. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. *J Microbiol Methods* **2015**, *118*, 152–158, doi:10.1016/j.mimet.2015.09.009.
226. Goletz, C.; Wagner, M.; Grübel, A.; Schmidt, W.; Korf, N.; Werner, P. Standardization of fluorescence excitation-emission-matrices in aquatic milieu. *Talanta* **2011**, *85*, 650–656, doi:10.1016/j.talanta.2011.04.045.
227. Larsson, T.; Wedborg, M.; Turner, D. Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter. *Anal Chim Acta* **2007**, *583*, 357–363, doi:10.1016/j.aca.2006.09.067.
228. Valet, G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2003**, *17*, 213–222.
229. Vees, C.A.; Veiter, L.; Sax, F.; Herwig, C.; Pflügl, S. A robust flow cytometry-based biomass monitoring tool enables rapid at-line characterization of *S. cerevisiae* physiology during continuous bioprocessing of spent sulfite liquor. *Anal Bioanal Chem* **2020**, *412*, 2137–2149, doi:10.1007/s00216-020-02423-z.
230. Schneckenburger, H. Fluorescence Techniques in Biomedical Diagnostics: Instrumentation, Analysis and Unresolved Issues. In *Standardization and quality assurance in fluorescence measurements*; Resch-Genger, U., Ameloot, M., Eds.; Springer: Berlin, 2008; pp 533–548, ISBN 978-3-540-70570-3.
231. Welsh, J.A.; Horak, P.; Wilkinson, J.S.; Ford, V.J.; Jones, J.C.; Smith, D.; Holloway, J.A.; Englyst, N.A. FCMPASS Software Aids Extracellular Vesicle Light Scatter Standardization. *Cytometry A* **2020**, *97*, 569–581, doi:10.1002/cyto.a.23782.
232. Perkin Elmer. LS45 user guide. Available online: <https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2019/04/LS-45-Users-Guide.pdf> (accessed on 5 August 2021).
233. Cervera, A.E.; Petersen, N.; Lantz, A.E.; Larsen, A.; Gernaey, K.V. Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. *Biotechnol Prog* **2009**, *25*, 1561–1581, doi:10.1002/btpr.280.
234. Samek, W.; Montavon, G.; Lapuschkin, S.; Anders, C.J.; Muller, K.-R. Explaining Deep Neural Networks and Beyond: A Review of Methods and Applications. *Proc. IEEE Inst. Electr. Electron. Eng.* **2021**, *109*, 247–278, doi:10.1109/JPROC.2021.3060483.

235. Priddy, K.L.; Keller, P.E. *Artificial neural networks: An introduction*; SPIE: Bellingham, Wash., 2005, ISBN 9780819459879.
236. Kovárová-Kovar, K.; Gehlen, S.; Kunze, A.; Keller, T.; Däniken, R.V.; Kolb, M.; van Loon, A.P. Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production. *J Biotechnol* **2000**, *79*, 39–52, doi:10.1016/S0168-1656(00)00211-X.
237. Xu, R.-Z.; Cao, J.-S.; Luo, J.-Y.; Feng, Q.; Ni, B.-J.; Fang, F. Integrating mechanistic and deep learning models for accurately predicting the enrichment of polyhydroxyalkanoates accumulating bacteria in mixed microbial cultures. *Bioresour Technol* **2022**, *344*, 126276, doi:10.1016/j.biortech.2021.126276.
238. Patnaik, P.R. Neural network designs for poly-beta-hydroxybutyrate production optimization under simulated industrial conditions. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 409–415, doi:10.1007/s10529-005-1775-0.
239. Peleato, N.M.; Legge, R.L.; Andrews, R.C. Neural networks for dimensionality reduction of fluorescence spectra and prediction of drinking water disinfection by-products. *Water Res* **2018**, *136*, 84–94, doi:10.1016/j.watres.2018.02.052.
240. Samantaray, S.; Mallick, N. Impact of Various Stress Conditions on Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Accumulation in *Aulosira fertilissima* CCC 444. *Curr Biotechnol* **2015**, *4*, 366–372, doi:10.2174/2211550104666150806000642.
241. Chen, Y.B.; Dominic, B.; Mellon, M.T.; Zehr, J.P. Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS 101. *J Bacteriol* **1998**, *180*, 3598–3605, doi:10.1128/JB.180.14.3598-3605.1998.
242. Tsujimoto, R.; Kamiya, N.; Fujita, Y. Identification of a cis-acting element in nitrogen fixation genes recognized by CnfR in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Mol Microbiol* **2016**, *101*, 411–424, doi:10.1111/mmi.13402.
243. Stal, L. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **1997**, *21*, 179–211, doi:10.1016/S0168-6445(97)00056-9.
244. Thiel, K.; Vuorio, E.; Aro, E.-M.; Kallio, P.T. The effect of enhanced acetate influx on *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. *Microb Cell Fact* **2017**, *16*, 21, doi:10.1186/s12934-017-0640-x.

245. Wu, G.; Wu, Q.; Shen, Z. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresour Technol* **2001**, *76*, 85–90, doi:10.1016/S0960-8524(00)00099-7.
246. Gomaa, E.Z. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Braz Arch Biol Technol* **2014**, *57*, 145–154, doi:10.1590/S1516-89132014000100020.
247. Obruca, S.; Marova, I.; Stankova, M.; Mravcova, L.; Svoboda, Z. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World J Microbiol Biotechnol* **2010**, *26*, 1261–1267, doi:10.1007/s11274-009-0296-8.
248. Obruca, S.; Marova, I.; Svoboda, Z.; Mikulikova, R. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiol. (Praha)* **2010**, *55*, 17–22, doi:10.1007/s12223-010-0003-z.
249. Monshupanee, T.; Incharoensakdi, A. Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 830–838, doi:10.1111/jam.12409.
250. Monshupanee, T.; Nimdach, P.; Incharoensakdi, A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. *Sci Rep* **2016**, *6*, 37121, doi:10.1038/srep37121.
251. Ahn, J.; Jho, E.H.; Nam, K. Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environ. Eng. Res.* **2015**, *20*, 246–253, doi:10.4491/eer.2015.055.
252. Egli, T.; Zinn, M. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnol Adv* **2003**, *22*, 35–43, doi:10.1016/j.biotechadv.2003.08.006.
253. Kamravamanesh, Pflügl et al 2017 - Photosynthetic poly- β -hydroxybutyrate accumulation in unicellular.pdf.
254. Pal, S.; Manna, A.; Paul, A.K. Nutritional and cultural conditions for production of poly-3-hydroxybutyric acid by *Azotobacter chroococcum*. *Folia Microbiol. (Praha)* **1998**, *43*, 177–181, doi:10.1007/BF02816506.

255. Panda, B.; Mallick, N. Enhanced poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Lett Appl Microbiol* **2007**, *44*, 194–198, doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x.
256. Bhati, R.; Mallick, N. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2012**, *87*, 505–512, doi:10.1002/jctb.2737.
257. Vanessa, C.C.; Da Cleber, K.S.; Ana, L.T.; Jorge, A.V.C.; Michele, G.d.M. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2015**, *9*, 1586–1594, doi:10.5897/AJMR2015.7530.
258. Wang, L.; Chen, L.; Yang, S.; Tan, X. Photosynthetic Conversion of Carbon Dioxide to Oleochemicals by Cyanobacteria: Recent Advances and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 634, doi:10.3389/fmicb.2020.00634.
259. Winckelmann, D.; Bleeke, F.; Bergmann, P.; Klöck, G. Growth of *Cyanobacterium aponinum* influenced by increasing salt concentrations and temperature. *3 Biotech* **2015**, *5*, 253–260, doi:10.1007/s13205-014-0224-y.
260. Peramuna, A.; Summers, M.L. Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol* **2014**, *196*, 881–890, doi:10.1007/s00203-014-1027-6.
261. Patel, V.K.; Sundaram, S.; Patel, A.K.; Kalra, A. Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production. *Arab J Sci Eng* **2018**, *43*, 109–121, doi:10.1007/s13369-017-2666-0.
262. Lu, J.; Xu, Y.; Wang, J.; Singer, S.D.; Chen, G. The Role of Triacylglycerol in Plant Stress Response. *Plants (Basel)* **2020**, *9*, doi:10.3390/plants9040472.
263. Yang, Y.; Benning, C. Functions of triacylglycerols during plant development and stress. *Curr Opin Biotechnol* **2018**, *49*, 191–198, doi:10.1016/j.copbio.2017.09.003.
264. Papapolymerou, G.; Gougoulas, N.; Metsoviti, M.N.; Kokkalis, A.; Kasiteropoulou, D.; Spiliotis, X.; Mpesios, A.; Papadopoulou, A. FAME and bio-oil properties and carbon yield coefficients of *Chlorella sorokiniana* cultivated heterotrophically with industrial effluents. *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, *30*, 100879, doi:10.1016/j.scp.2022.100879.

265. Duangsri, C.; Mudtham, N.-A.; Incharoensakdi, A.; Raksajit, W. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation in heterotrophically grown *Arthrospira platensis* under nitrogen deprivation. *J. Appl. Phycol.* **2020**, *32*, 3645–3654, doi:10.1007/s10811-020-02272-4.
266. Zhou, X.-Y.; Yuan, X.-X.; Shi, Z.-Y.; Meng, D.-C.; Jiang, W.-J.; Wu, L.-P.; Chen, J.-C.; Chen, G.-Q. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2012**, *11*, 54, doi:10.1186/1475-2859-11-54.
267. Utsunomia, C.; Ren, Q.; Zinn, M. Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 257, doi:10.3389/fbioe.2020.00257.
268. Kavitha, G.; Kurinjimalar, C.; Sivakumar, K.; Palani, P.; Rengasamy, R. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 700–706, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.086.
269. Cassuriaga, A.P.A.; Freitas, B.C.B.; Morais, M.G.; Costa, J.A.V. Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. *Bioresour Technol* **2018**, *265*, 456–463, doi:10.1016/j.biortech.2018.06.026.
270. Robert, R.; Iyer, P.R. Isolation and Optimization of PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) Based Biodegradable Plastics from *Chlorella vulgaris*. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **2018**, *09*, doi:10.4172/2155-6199.1000433.
271. *Fluorescence Methods for Investigation of Living Cells and Microorganisms*; Grigoryeva, N., Ed.; IntechOpen, 2020, ISBN 978-1-83968-039-7.
272. Domozych, D.S.; Ciancia, M.; Fangel, J.U.; Mikkelsen, M.D.; Ulvskov, P.; Willats, W.G.T. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front Plant Sci* **2012**, *3*, 82, doi:10.3389/fpls.2012.00082.
273. Li, C.; Wu, H.; Xiang, W.; Wu, H.; Wang, N.; Wu, J.; Li, T. Comparison of Production and Fluorescence Characteristics of Phycoerythrin from Three Strains of Porphyridium. *Foods* **2022**, *11*, doi:10.3390/foods11142069.
274. Harmon, J.; Mikami, H.; Kanno, H.; Ito, T.; Goda, K. Accurate classification of microalgae by intelligent frequency-division-multiplexed fluorescence imaging flow cytometry. *OSA Contin.* **2020**, *3*, 430, doi:10.1364/OSAC.387523.
275. Wang, J.; Zhao, J.; Wang, Y.; Wang, W.; Gao, Y.; Xu, R.; Zhao, W. A New Microfluidic Device for Classification of Microalgae Cells Based on Simultaneous Analysis of Chlorophyll Fluorescence, Side Light Scattering, Resistance Pulse Sensing. *Micromachines (Basel)* **2016**, *7*, doi:10.3390/mi7110198.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Matthias Noll, der die Kooperation der Hochschule Anhalt mit der Hochschule für angewandte Naturwissenschaften in Coburg und der Universität Bayreuth ermöglichte, woraus diese Promotionsarbeit erst entstehen konnte. Trotz der räumlichen Distanz und der sich entwickelten Thematik konnte ich auch in schwierigen Situationen auf seinen Rat und Unterstützung zählen.

Ein großer Dank gilt ebenso Frau Prof. Carola Griehl, die mir den Freiraum zur Findung eigener Forschungsschwerpunkte ermöglichte, wodurch ich mich nicht nur thematisch, sondern auch persönlich weiterentwickeln konnte. Dazu zählte genauso die Bereitstellung aller notwendigen Ressourcen, die zur Erstellung dieser Arbeit nötig waren. Auch wenn meine Herangehensweise nicht immer der der Arbeitsgruppe oblag, fand ich in ihr immer einen Förderer meiner kreativen Ansichten und Ideen. Durch die ebenso übertragene Verantwortung in weiteren wissenschaftlichen Projekten konnte ich ebenfalls wichtige Erfahrungen für meine Karriere außerhalb des „Elfenbeinturms“ erlangen.

Ich danke Herrn Prof. Römpp für die Annahme des Mentorats und allen weiteren Gutachtern für ihre Zeit zur Erstellung der Gutachten.

Ich danke ebenfalls allen Kolleginnen und Kollegen, die mich bei meinem Werdegang begleitet haben. Dabei gebührt besonderer Dank Anita Czech und Franziska Büschelberger die mir stets im Labor motivierend und unterstützend zur Seite standen. Ich danke auch Mario Salisch für die liebevolle Pflege der Algenstammsammlung und Simone Bieler, die mir mit ihrem Wissen als „Wikipedia“ oft behilflich war. Ebenso bedanke ich mich bei Anna-Lena Höger und Christian Kleinert; es war *summa summarum* eine schöne und lehrreiche Doktorandenzeit.

Danksagung

Ein weiterer Dank geht an den Fachbereich und Dekan (Prof. Dr. Steffen Sommer) für angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik und an die Graduiertenakademie der Hochschule Anhalt (Dr. Kai-Friederike Oelbermann und Dr. Ulrike Herbert) die mir eine Promotionsstelle bereitstellten und somit einen Teil meiner Promotionszeit finanziert hatten.

Ich danke Dr. Annika Gloss und Dr. Thomas Dams, die mich während meiner Zeit bei Roche Diagnostics auf diesen Weg gebracht hatten.

Bei Prof. Dr. Serap Evran bedanke ich mich für die schöne Zeit an der Ege Universität, die mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich weiterbrachte.

Und ein liebster Dank geht an meine Familie für die moralische Unterstützung und aufmunternden Worte. Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Mutter Petra von Borries, ihrem Mann Wolf von Borries und meiner Oma Hanna Kreutzer, die nie verstanden haben, was ich eigentlich tat aber immer daran glaubten.

Und ich danke meiner Frau Merve und meiner Tochter Ayşe Sofia, die mich stets ertragen durften und weiterhin auch müssen.

10 Anhang

10.1 Abbildungen

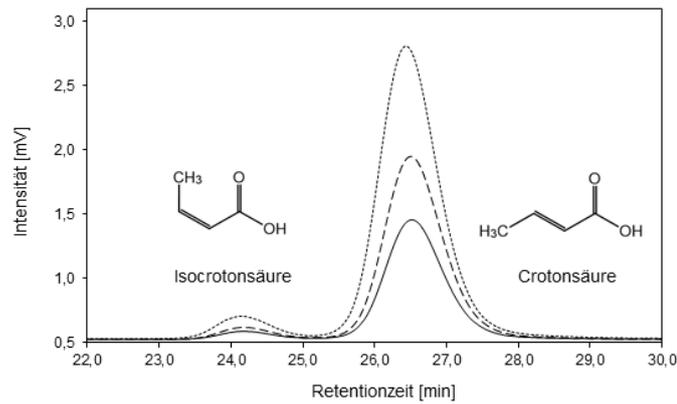


Abb. A 1: Chromatographische Auftrennung der Polyhydroxybutyrat-Hydrolyseprodukte Isocrotonsäure und Crotonsäure der Standardlösungen.

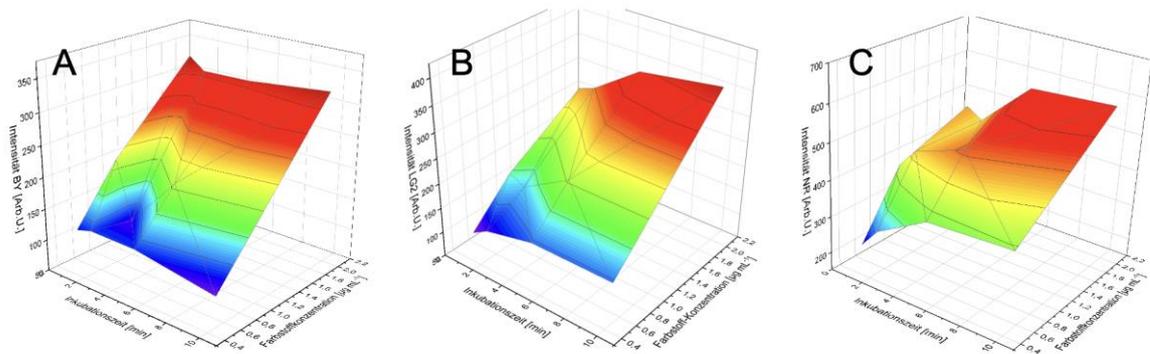


Abb. A 2: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Inkubationszeit (x-Achse) und der Farbstoffkonzentration (y-Achse) der Fluoreszenzfarbstoffe BODIPY^{493/503} (A), LipidGreen2 (B) und Nile red (C) bei der Optimierung des Färbeprozesses der Polyhydroxybutyrat-Konzentration in *Cupriavidus necator*.

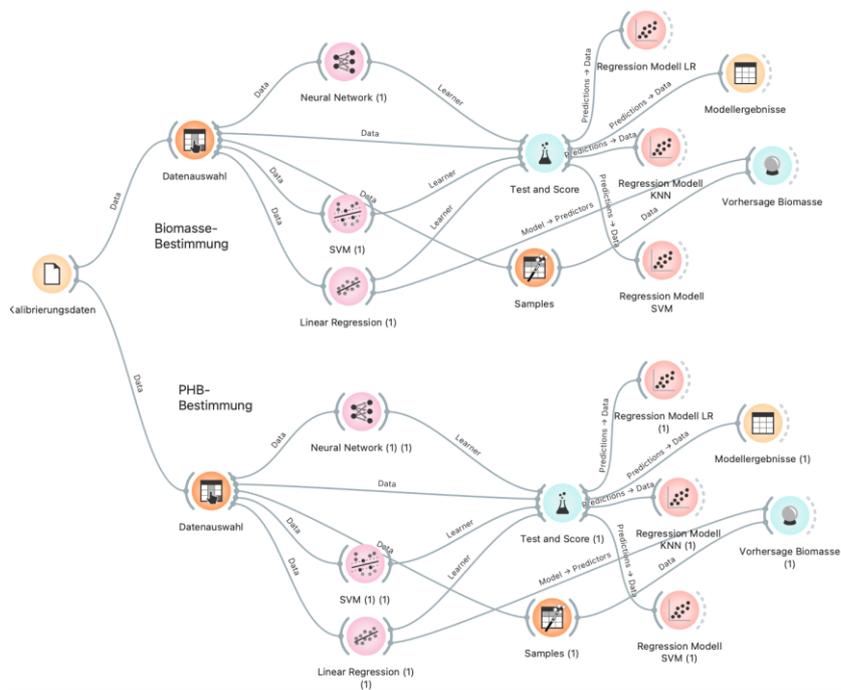


Abb. A 3: Schematischer Aufbau und Modellvergleich zur Bestimmung der Biomasse-Konzentration (oberer Weg) und Polyhydroxybutyrat -Konzentration (unterer Weg) durch Fluoreszenzdaten.

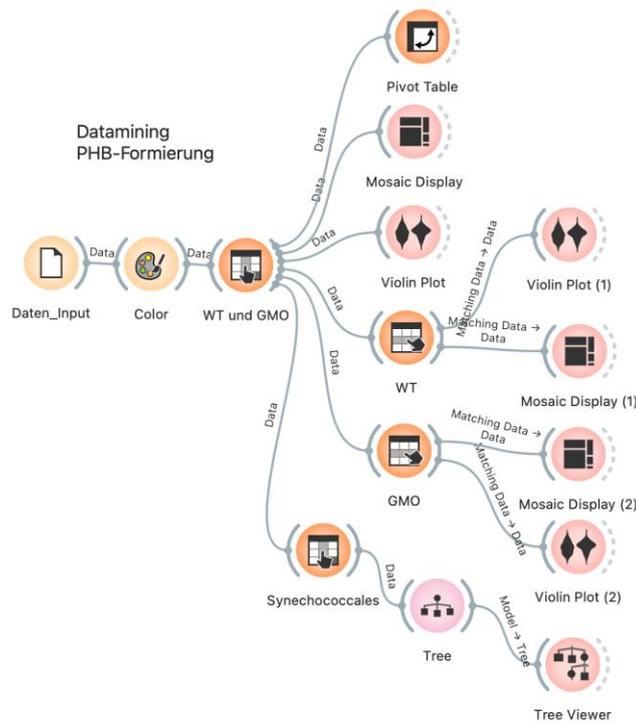


Abb. A 4: Modellaufbau der Analyse geeigneter Kultivierungsbedingungen für die Induktion von Polyhydroxybutyrat in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. Modellerstellung mit Orange.

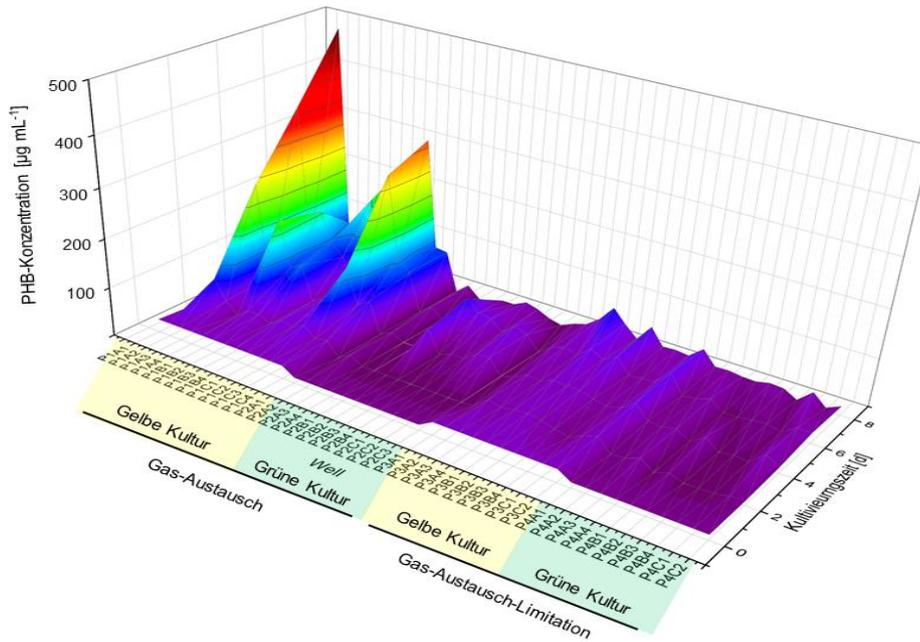


Abb. A 5: Auftragung gemessener Polyhydroxybutyrat-Konzentrationen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255.

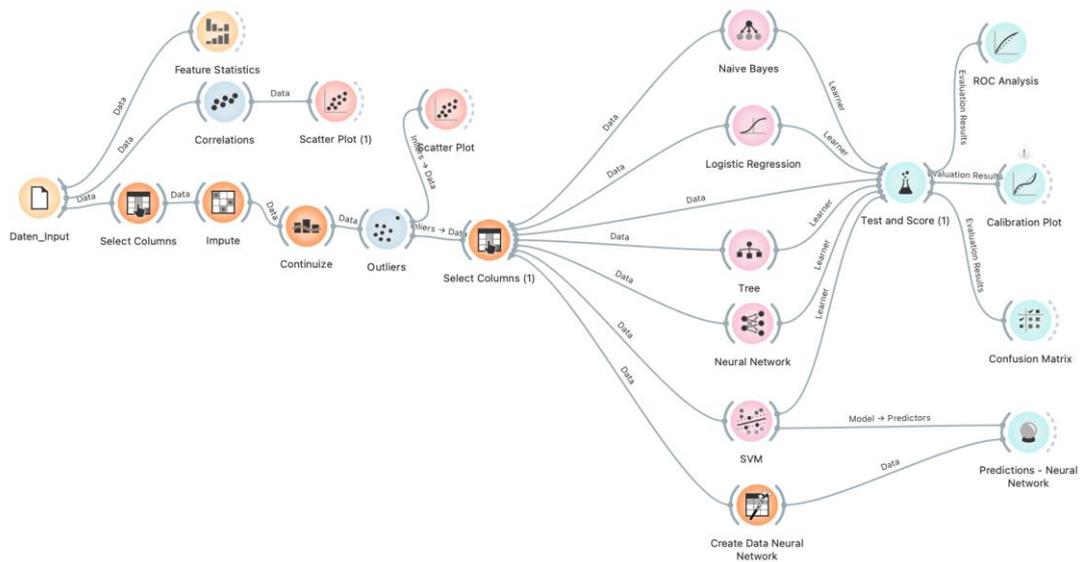


Abb. A 6: Schematischer Aufbau und Modellvergleich für die Klassifizierung der Speicherlipide auf Basis der Fluoreszenzdaten.

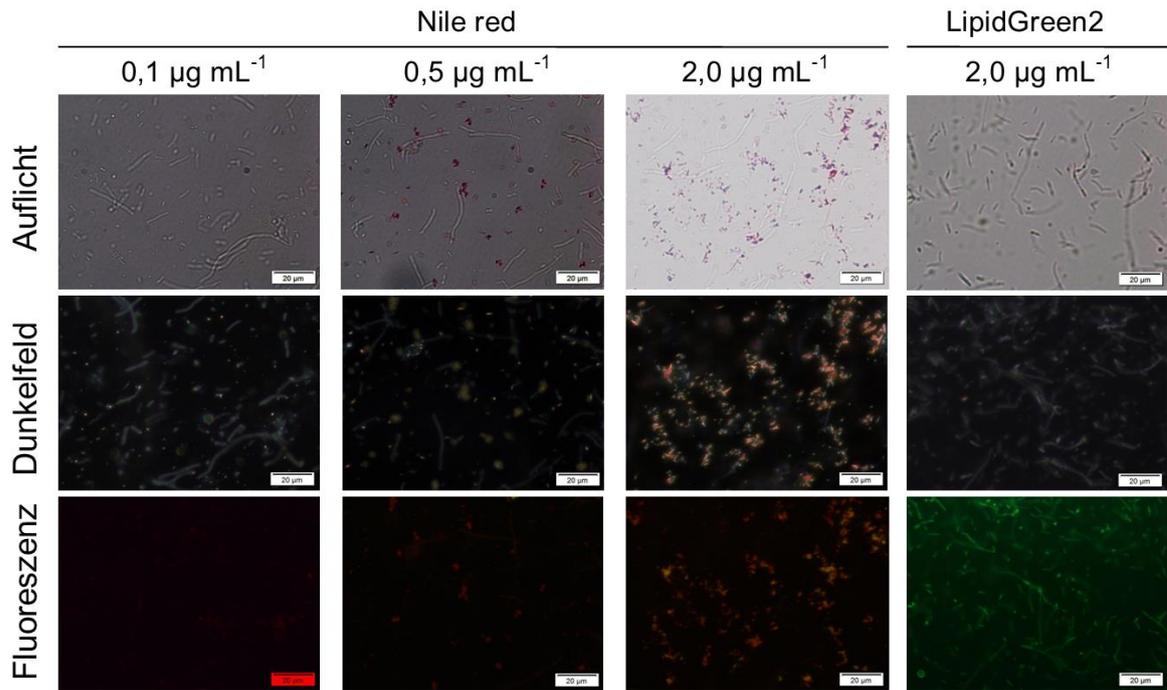


Abb. A 7: Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von Nile red und LipidGreen2 in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration während der Anfärbung von Polyhydroxybutyrat in *Cupriavidus necator*.

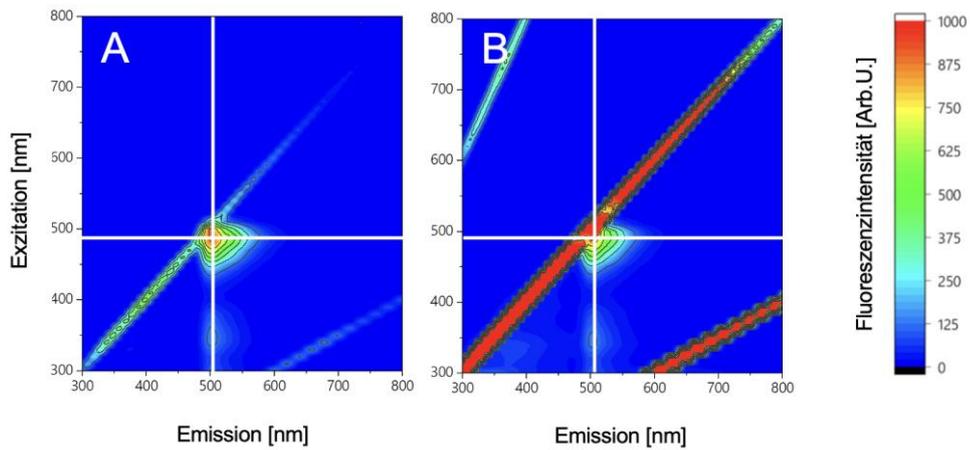


Abb. A 8: 3D-Exzitations- und Emissionsmatrix von BODIPY^{493/503} in polarer (PBS-Puffer, **A**) und hydrophober Umgebung (Polyhydroxybutyrat in *Cupriavidus necator*, **B**).

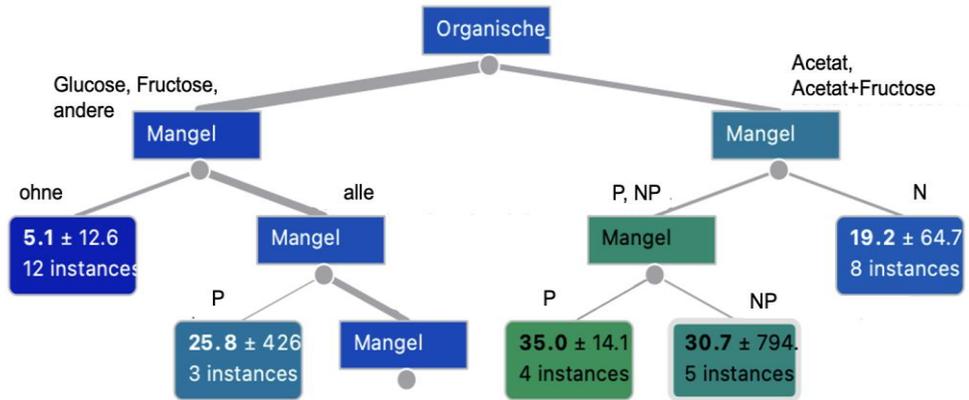


Abb. A 9: Entscheidungsbaum mit der Zielgröße der Polyhydroxybutyrat-Konzentration in synechococcalen Cyanobakterien. Erstellt mit Orange.

10.2 Tabellen

Tab. A 1: Angewandte Formeln zur Verrechnung des Seitwärtsstreulichts (SSC) mit der Rohfluoreszenz (RF).

Name	Abkürzung	Verrechnungstyp	Nr.
Roh-Fluoreszenz	RF	-	(1)
Wurzel aus Roh-Fluoreszenz	S_RF	\sqrt{RF}	(2)
Logarithmus Roh-Fluoreszenz	ln_RF	$\ln RF$	(3)
Harmonische Mittel	HM	$(RF \cdot SSC)(RF + SSC)^{-1}$	(4)
Arithmetisches Mittel	AM	$\frac{1}{2}(RF + SSC)$	(5)
Wurzel aus Arithmetischen Mittel	S_AM	$\sqrt{\frac{1}{2}(RF + SSC)}$	(6)
Produkt	PR	$RF \cdot SSC$	(7)
Wurzel aus Produkt	S_PR	$\sqrt{RF \cdot SSC}$	(8)
Quotient	QU	$RF \cdot SSC^{-1}$	(9)
Wurzel aus Quotienten	S_QU	$\sqrt{RF \cdot SSC^{-1}}$	(10)
Differenz	DI	$RF - SSC$	(11)
Wurzel aus Differenz	S_DI	$\sqrt{RF - SSC}$	(12)

Tab. A 2: Vergleich der Korrelationskoeffizienten (R) der modellbasierten Biomasse und der Polyhydroxybutyrat -Konzentration-Bestimmung mit LipidGreen2-Fluoreszenz in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255. MAE: Mittlerer absoluter Fehler. Fluoreszenzsignale (FL): Int: Intensität bei 510 nm, A: Emissionsfläche. Modelle: LR: Lineare Regression, KNN: Künstliches Neuronales Netzwerk, SVM: Support Vector Machines. Modellinput: SSC und RF. Erstellt mit Orange.

Kultur	Zielgröße	FL	LR		KNN		SVM	
			R	MAE	R	MAE	R	MAE
Alle	Biomasse	Int	0,2300	0,3400	-0,1620	0,3810	-0,3980	0,5060
		A	-0,1330	0,3910	-0,6950	0,4380	-0,1150	0,3560
	PHB	Int	0,9879	7,6420	-1,6480	56,6800	-0,1520	36,5100
		A	0,8380	14,9050	-1,7220	57,5900	-0,1660	36,8960
N-Mangel	PHB	Int	0,9755	8,5270	-2,1490	52,6270	-1,0020	47,6040
		A	0,8190	12,6750	-2,2030	54,0520	-1,0000	47,5260
NP _i -Mangel	PHB	Int	0,9812	11,3020	-0,8550	42,7310	-0,8980	55,5730
		A	-1,1660	40,9060	-0,9190	48,0300	-0,9000	55,6600

Tab. A 3: Confusion Matrix der Klassifizierung der mit LipidGreen2 erhobenen Fluoreszenzdaten mit der Zielgröße: Organismus. Modell: Logistische Regression. Input: SSC, RF. Fehlklassifizierung ist kursiv dargestellt. Angegeben ist die Übereinstimmung in % über alle Klassen.

	<i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA CYA 255	<i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i>	<i>Porphyridium</i> <i>purpureum</i>	<i>Stichococcus</i> sp. WB02
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA CYA 255	100,0%			
<i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i>		88,9%		
<i>Porphyridium</i> <i>purpureum</i>			77,8%	16,7%
<i>Stichococcus</i> sp. WB02		11,1%	22,2%	83,3%

Tab. A 4: Verwendete Referenzen für die Metadatenanalyse zur Ermittlung geeigneter Kultivierungsstrategien für die Polyhydroxybutyrat -Bildung in *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255.

Nr.	Ordnung	Organismus	Typ	Trophie	Mangel	C-Quelle	PHA [% _{max}]	DOI
1	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	4	https://doi.org/10.1038/srep37121
2	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	18	https://doi.org/10.1038/srep37121
3	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	Phosphat	ohne	16	https://doi.org/10.1038/srep37121
4	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	17	https://doi.org/10.1038/srep37121
5	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	0,8	https://doi.org/10.1038/srep37121
6	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Pyruvat	0,4	https://doi.org/10.1038/srep37121
7	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Citrat	0,3	https://doi.org/10.1038/srep37121
8	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Glucose	3,4	https://doi.org/10.1038/srep37121
9	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Fructose	3,2	https://doi.org/10.1038/srep37121
10	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Acetat	11,8	https://doi.org/10.1038/srep37121
11	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Pyruvat	0,5	https://doi.org/10.1038/srep37121
12	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Citrat	5,7	https://doi.org/10.1038/srep37121
13	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Glucose	6,7	https://doi.org/10.1038/srep37121
14	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Fructose	8,1	https://doi.org/10.1038/srep37121
15	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Heterotroph	ohne	Acetat	1,8	https://doi.org/10.1038/srep37121

Anhang

16	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Heterotroph	Nitrat	Acetat	19,5	https://doi.org/10.1038/srep37121
17	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Heterotroph	Phosphat	Acetat	36	https://doi.org/10.1038/srep37121
18	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Heterotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	30,7	https://doi.org/10.1038/srep37121
19	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	10	https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90353-0
20	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90353-0
21	Chroococcales	<i>Chlorogloea fritschii</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1128/jb.106.2.683-686.1971
22	Chroococcales	<i>Chroococcus sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2,9	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
23	Chroococcales	<i>Gleocapsa gelatinosa</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	5,8	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
24	Chroococcales	<i>Gloeotheca sp.</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	9	
25	Chroococcales	<i>Gloeotheca sp.</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	9	https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05835.x
26	Nostocales	<i>Anabaena cylindrica</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0,01	https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00985-X
27	Nostocales	<i>Anabaena cylindrica</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Propionat	2	https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00985-X
28	Nostocales	<i>Anabaena sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	1,9	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
29	Nostocales	<i>Anabaena sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2,3	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
30	Nostocales	<i>Anabaena variabilis</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
31	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Fructose+Valerat	77	https://doi.org/10.1007/s10811-013-0073-9
32	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	Phosphat	Acetat+Citrat	85	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
33	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	6,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
34	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	9,8	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
35	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Phototroph	Phosphat	ohne	10,5	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
36	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	27,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
37	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Glucose	19,3	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
38	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Fructose	15,9	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
39	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Sucrose	24	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
40	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Maltose	16,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
41	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Mixotroph	ohne	Citrat	34,2	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
42	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotroph	ohne	ohne	13,5	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7

Anhang

43	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Acetat	24,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
44	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Glucose	15,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
45	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Sucrose	21,3	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
46	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Citrat	19,9	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
47	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Fructose	23,1	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
48	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Heterotr oph	Phosphat	Acetat+Citrat	80,4	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9699-7
49	Nostocales	<i>Aulosira fertilissima</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
50	Nostocales	<i>Calothrix brevisseima</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1,8	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
51	Nostocales	<i>Calothrix scytonemicola</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	3,5	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.035
52	Nostocales	<i>Calothrix scytonemicola</i>	WT	Phototr oph	Nitrat	ohne	25,4	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.035
53	Nostocales	<i>Calothrix scytonemicola</i>	WT	Phototr oph	Nitrat	ohne	25	https://doi.org/10.1038/srep37121
54	Nostocales	<i>Chlorogloeopsis s p.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	4,6	https://doi.org/10.3390/bioengineering9040178
55	Nostocales	<i>Cylindrospermum sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
56	Nostocales	<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	2,4	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
57	Nostocales	<i>Michrochaete sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	3	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
58	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Mixotro ph	Nitrat	Acetat+Valerat	60	https://doi.org/10.1002/jctb.2737
59	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Phototr oph	Phosphat	ohne	22	https://doi.org/10.1007/s10811-011-9663-6
60	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Phototr oph	Nitrat+Phosphat	ohne	8,7	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009
61	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Phototr oph	Phosphat	ohne	22	https://doi.org/10.1007/s10811-015-0573-x
62	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Phototr oph	Nitrat+Phosphat	ohne	22	https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.002
63	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Mixotro ph	Nitrat	Acetat+Valerat	58	https://doi.org/10.1002/jctb.2737
64	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Heterotr oph	ohne	Glucose	40	https://doi.org/10.1007/s10529-004-6586-1
65	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Mixotro ph	ohne	Acetat+Glucose+Valerat	70	https://doi.org/10.1007/s10811-015-0573-x
66	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Mixotro ph	Nitrat	Acetat+Glucose+Valerat	78	https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.003
67	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Heterotr oph	Nitrat+Phosphat	Acetat	35	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009
68	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6,4	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168

Anhang

69	Nostocales	<i>Nostoc pludosum</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
70	Nostocales	<i>Nostoc punctiforme</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6,2	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
71	Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	0,54	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
72	Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	0,58	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
73	Nostocales	<i>Nostoc sphaericum</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6,1	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
74	Nostocales	<i>Scytonema sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1,8	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
75	Nostocales	<i>Tolypothrix tenuis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	2,1	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
76	Nostocales	<i>Westiellopsis prolifica</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	2,2	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
77	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira maxima</i>	WT	Mixotro ph	ohne	Acetat	5	https://doi.org/10.1099/00221287-138-8-1623
78	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira maxima</i>	WT	Phototr oph	Nitrat+Phos phat	ohne	8	https://doi.org/10.1099/00221287-138-8-1623
79	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1128/jb.149.1.361-363.1982
80	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	Phosphat	ohne	3,5	https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.002
81	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	22	https://doi.org/10.1155/2015/967814
82	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1128/jb.149.1.361-363.1982
83	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Mixotro ph	Nitrat	Acetat	10	
84	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	0,8	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
85	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	GMO	Phototr oph	ohne	ohne	30	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.105
86	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira platensis</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1128/jb.149.1.361-363.1982
87	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1,18	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
88	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Phototr oph	Nitrat	ohne	44,2	https://doi.org/10.1155/2014/895237
89	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Phototr oph	Nitrat	ohne	30,7	https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7530
90	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	10,6	https://doi.org/10.1007/s12010-017-2687-x
91	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira subsala</i>	WT	Phototr oph	Nitrat	ohne	14,7	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001
92	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira Subsala</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1,3	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001
93	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira Subsala</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1,5	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001
94	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Phototr oph	ohne	ohne	1	https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2791-2792.1990
95	Oscillatoriale s	<i>Arthrospira sp.</i>	WT	Mixotro ph	ohne	Acetat	2,5	https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2791-2792.1990

Anhang

96	Oscillatoriales	<i>Lyngbya sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2,9	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
97	Oscillatoriales	<i>Lyngbya sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0,71	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
98	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria limosa</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1007/978-94-009-2129-0_38
99	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria limosa</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	9	https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05835.x
100	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
101	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria willei</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0,42	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
102	Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2,2	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
103	Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	7,6	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
104	Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0,9	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
105	Oscillatoriales	<i>Plectonema sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
106	Synechococcales	<i>Aphanocapsa sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	2,1	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
107	Synechococcales	<i>Leptolyngbya sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Acetat	20,6	https://doi.org/10.3390/biom12040504
108	Synechococcales	<i>Leptolyngbya sp.</i>	WT	Mixotroph	Phosphat	Acetat	7,4	https://doi.org/10.3390/biom12040504
109	Synechococcales	<i>Leptolyngbya sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	32,3	https://doi.org/10.3390/biom12040504
110	Synechococcales	<i>Leptolyngbya sp.</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat	2,5	https://doi.org/10.3390/biom12040504
111	Synechococcales	<i>Synechococcus elongatus</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Sucrose	17,2	https://doi.org/10.1089/ind.2016.0021
112	Synechococcales	<i>Synechococcus sp.</i>	WT	Phototroph	Phosphat	ohne	55	https://doi.org/10.1023/A:1010551614648
113	Synechococcales	<i>Synechococcus sp.</i>	GMO	Mixotroph	Nitrat	Acetat	25,6	https://doi.org/10.1023/A:1005392827791
114	Synechococcales	<i>Synechococcus sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	4,6	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
115	Synechococcales	<i>Synechococcus sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	27	https://doi.org/10.1128/jb.179.16.5009-5013.1997
116	Synechococcales	<i>Synechocystis salina</i>	WT	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	4,4	https://doi.org/10.1007/s10811-022-02693-3
117	Synechococcales	<i>Synechocystis salina</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	15	https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.011
118	Synechococcales	<i>Synechocystis salina</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	6	https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.020
119	Synechococcales	<i>Synechocystis salina</i>	WT	Mixotroph	ohne	Restbiomasse	5,5	https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.020
120	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	4,5	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
121	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	9,5	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
122	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Acetat	14,6	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013

Anhang

12 3	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Phosphat	ohne	11,2	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
12 4	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Phosphat	Acetat	28,8	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
12 5	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	1	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
12 6	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	9,5	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
12 7	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Acetat	14,9	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
12 8	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	13	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
12 9	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	15,5	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
13 0	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Heterotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	2	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
13 1	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Phototroph	ohne	ohne	13	https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00966
13 2	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Phosphat	Acetat	38	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
13 3	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	ohne	16	https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9
13 4	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	3	https://doi.org/10.1023/A:1005392827791
13 5	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	Nitrat	Acetat	25,6	https://doi.org/10.1023/A:1005392827791
13 6	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	12,5	https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.011
13 7	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Phototroph	Nitrat	ohne	12,4	https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.013
13 8	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Mixotroph	Nitrat	Acetat	11	https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00010-7
13 9	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Phototroph	Nitrat	ohne	1,4	https://doi.org/10.1093/dnares/dst028
14 0	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Phototroph	Nitrat	ohne	7	https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.004
14 1	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Mixotroph	Nitrat	Acetat	35	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014
14 2	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GVO	Mixotroph	Nitrat	Acetat	15,8	https://doi.org/10.1007/s1120-017-0464-x
14 3	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Phototroph	Nitrat	ohne	1	https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00010-7
14 4	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Mixotroph	Nitrat	Acetat	11	https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00010-7
14 5	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	14	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086368
14 6	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	41	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086368
14 7	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Phototroph	Nitrat	ohne	52	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.058
14 8	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	63	https://doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1
14 9	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Mixotroph	Nitrat+Phosphat	Acetat	81	https://doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1

Anhang

150	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	11,4	https://doi.org/10.3390/bioengineering9040178
151	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	4	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.14951
152	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	3,8	https://doi.org/10.1007/s10811-022-02693-3
153	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat+Phosphat	ohne	2,2	https://doi.org/10.1007/s10811-022-02693-3
154	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	4,1	https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00099-7
155	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Nitrat	ohne	9,5	https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x
156	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	Phosphat	ohne	11,2	https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x
157	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Phototroph	Nitrat	ohne	26	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014
158	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Mixotroph	ohne	Acetat+Fructose	38	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013
159	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	GMO	Mixotroph	ohne	Acetat	35	https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014
160	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	4,7	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168
161	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	0,83	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14
162	Synechococcales	<i>Synechocystis sp.</i>	WT	Phototroph	ohne	ohne	3,75	https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14

11 Publikationsliste

11.1 Fachartikel mit Bezug zur Promotion

Kettner, A., Noll, M., & Griehl, C. (2022). *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255, a Promising Candidate for Poly (3-hydroxybutyrate) Production under Mixotrophic Deficiency Conditions. *Biomolecules*, 12(4), 504. DOI: 10.3390/biom12040504

Kettner, A., Noll, M., & Griehl, C. (2022). *In situ* quantification of poly (3-hydroxybutyrate) and biomass in *Cupriavidus necator* by a fluorescence spectroscopic assay. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 635-645. DOI: 10.1007/s00253-021-11670-8

Griehl, C., **Kettner, A.,** Noll, M., & Bieler, S. (2021). Fluorimetrische Bestimmung von intrazellulären Polyhydroxyalkanoaten. *BIOSpektrum*, 27(2), 152-155. DOI: 10.1007/s12268-021-1558-8

Kettner, A., & Griehl, C. (2020). The use of LipidGreen2 for visualization and quantification of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) in *Cupriavidus necator*. *Biochemistry and biophysics reports*, 24, 100819. DOI: 10.1016/j.bbrep.2020.100819.

11.2 Konferenzbeiträge

Kettner, A., Noll, M., & Griehl, C. (2019), Fluorescence-based quantification of microbial storage lipids during cultivation, 12. Bundesalgenstammtisch, Kiel (Vortrag)

Kettner, A., Noll, M., & Griehl, C. (2019), Quantification of Polyhydroxyalkanoates in bacteria by fluorescence labeling, ZAW Biotech Symposium (Poster)

Kettner, A. & Griehl, C., Biopolymere aus Algen (2019), Symposium Bioplastik oder beides, HS BURG Giebichenstein, Halle (Saale) (Vortrag)

Kettner, A., Reinecke-Levi, D.L, Noll, M., & Griehl, C. (2018), Quantifizierung von Polyhydroxyalkanoaten in Bakterien mittels Fluoreszenzmarkierung, 11. Bundesalgenstammtisch, Karlsruhe (Poster)

Kettner, A., Noll, M., & Griehl, C. (2018), Quantifizierung von intrazellulären hydrophoben Speicherlipiden in Mikroorganismen mittels Fluoreszenzmarkierung, NWK, Köthen 2018 (Poster)

11.3 Mitarbeit an Experimenten

An folgenden Kapiteln waren neben dem Autor auch folgende Personen praktisch beteiligt:

Kapitel 4.3.1: Entwicklung PCR-Methodik zur Detektion von cyanobakteriellen PHB-Bildnern im Zusammenhang mit der Projektarbeit von Domenik Stuhlmacher.

Kapitel 4.3.4: Kultivierung und Beprobung während der phototrophen Phase von *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255 im Zusammenhang mit Projektarbeit von Philipp Sengupta und Katharina Kottwitz.

Kapitel 4.4.2: Unterstützung bei der Kultivierung und Beprobung durch die technischen Mitarbeiterinnen Anita Czech, Franziska Büschelberger und Mercedes Scharfe.

12 Eidesstattliche Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 97 Abs. 1 Satz 8 BayHIG).

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

24.06.2024, Sion, _____

Datum, Ort, Unterschrift