



Leibniz  
Universität  
Hannover

## Bachelorarbeit

im Institut für biologische Produktionssysteme  
und im Institut für Botanik

Thema:

**Anzucht von einzelligen Grünalgen unter optimierten  
Bedingungen für die Produktion von Carotinoiden**

Verfasser: Andreas Kitsche

Matrikelnummer: 2499720

Abgabedatum: 12. September 2008

Fachprüfer:

Prof. Dr. Susanne Bickel - Institut für Biochemie der Pflanzen  
AG Fachdidaktik (Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf)

Prof. Dr. Thomas Rath - Institut für biologische Produktions-  
systeme – Fachgebiet Biosystem-  
und Gartenbautechnik der  
naturwissenschaftlichen Fakultät  
(Leibniz Universität Hannover)

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Hypothese .....	6
3	Material und Methoden.....	7
3.1	Photobioreaktor.....	7
3.1.1	Aufbau des Photobioreaktors .....	7
3.1.2	Kalibrierung der Temperaturfühler.....	10
3.1.3	Mess- und Regelungstechnik des Photobioreaktors.....	11
3.1.4	Analytische Verfahren .....	13
3.2	Der Versuch .....	16
3.2.1	Algenstamm .....	16
3.2.2	Versuchs-Set-up.....	16
3.2.3	Versuchsdurchführung .....	18
4	Ergebnisse.....	18
4.1	Zellauflösung.....	19
4.2	Biomasseproduktion.....	20
4.3	Pigmentgehalte .....	25
5	Diskussion .....	31
6	Literatur .....	35
7	Danksagung .....	37

## 1 Einleitung

Mikroalgen kombinieren das schnelle und einfache Wachstum von Bakterien und anderen einzelligen Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum. Unter anderem diesem Umstand verdanken sie es, dass sie für die moderne Biotechnologie von zunehmender Bedeutung sind. Schon heute werden sie trotz der hohen Produktionskosten (5-20 US\$ pro Gramm Trockengewicht) zur Produktion von hochwertigen Metaboliten verwendet (Léon *et al.* 2007). So wird das Cyanobakterium *Spirulina* in den USA, China, Indien und Kuba für die Gesundheits- und Ernährungsindustrie, in Australien und Israel die Alge *Dunaliella* zur  $\beta$ -Carotin-Herstellung angebaut (Lorenz und Cysewski 2000).

Es gibt viele Argumente, die für die Verwendung von Mikroalgen zur Produktion von hochwertigen Stoffen sprechen. Mikroalgen gehören zu den am schnellsten autotroph wachsenden Organismen der Erde und benötigen nur leicht verfügbare Komponenten für ihr Wachstum (Mineralsalze, CO<sub>2</sub>, Wasser, Sonnenlicht). Außerdem produzieren Mikroalgen ein weites Spektrum an natürlichen Produkten, wie z.B. Pigmente, Enzyme, Proteine, Zucker, Fettsäuren, Vitamine und weitere seltene, biologisch aktive Komponenten, entsprechend ihrer enormen Vielzahl von über 30.000 Arten (Olaizola 2000).

Unter den Pigmenten spielen für die industrielle Produktion die Carotinoide, die in der Natur zu den verbreitetsten Pigmenten gehören, eine entscheidende Rolle. Der Begriff Carotinoide umfasst eine Gruppe von über 700 gelben, orangen und roten, fettlöslichen Pigmenten, die in der Natur hauptsächlich von Phytoplankton, Algen und Pflanzen gebildet werden. Sie sind in allen Organismen vorhanden, die Photosynthese betreiben und gehören zur Gruppe der Tetraterpene. Zu den Carotinoiden gehören Kohlenwasserstoffe (Carotine) und deren sauerstoffhaltige Derivate (Xanthophylle). Charakteristisch für diese Pigmente sind zahlreiche konjugierte Doppelbindungen, die den Verbindungen eine gelbe bis rote Farbe verleihen. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima hängen von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen ab. Carotinoide werden nur in höheren Pflanzen und Mikroorganismen gebildet. In verschiedenen Organen, die keine Photosynthese betreiben, sammeln sie sich in größeren Mengen in Chromoplasten an und sind Ursache für die Farbenvielfalt von Blüten und Früchten. Sie binden an die integralen Proteine der Thylakoidmembranen, wo sie am Lichtsammelkomplex beteiligt sind und verhindern Schädigungen des Photosyntheseapparates. Die Synthese von  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Carotin ausgehend von dem farblosen Carotinoid Phytoene ist der universelle Syntheseweg in höheren Pflanzen und grünen Algen. In den meisten grünen Geweben sind die hydrophilierten Derivate, wie Lutein und Zeaxanthin, zu finden. Weitaus seltener kommen die Ketocarotinoide, wie Astaxanthin und Canthaxanthin, die nur in einigen Bakterien, Cyanobakterien oder Pilzen synthetisiert werden, vor. Auch in bestimmten Mikroalgen, wie den Chlorophyten *Haematococcus pluvialis* und *Chlorella zofigiensis* findet man die seltenen Ketocarotinoide.

Carotinoide werden in der Industrie schon seit langem als natürliche Pigmente und Provitaminfaktoren genutzt. Tiere und andere Organismen, die Carotinoide nicht *de novo* synthetisieren können, benötigen diese in ihrer Nahrung, um ihre charakteristische Farbe ausbilden zu können. Dies ist z.B. bei Lachsen, Shrimps und vielen anderen Tieren der Fall. Carotinoide sind des Weiteren Vorläufer von essentiellen Stoffwechselkomponenten, wie Vitamin A oder dem Sehpigment Retinal. Es ist erwiesen, dass die Einnahme von Carotinoiden Muskeldegenerationen, UV-induzierten Hautschäden und einigen altersbedingten degenerativen Krankheiten entgegenwirkt. (Léon *et al.* 2007).

Es wird von mehreren unterschiedlichen Grünalgen berichtet, die große Mengen an Carotinoiden akkumulieren, wenn sie unter Stressbedingungen wachsen. Die beiden wichtigsten Funktionen dieser Pigmente im Rahmen der Photosynthese sind die Lichtsammlung, sowie der Schutz des Photosyntheseapparates vor potentieller Schädigung infolge der übermäßigen Lichtanregung. So wird β-Carotin in hohem Maße von *Dunaliella* Arten angereichert. Die Fähigkeit zur Biosynthese des Ketocarotinoids Astaxanthin ist auf eine geringe Anzahl an Organismen beschränkt, wie die zu den Basidiomyceten zählende Hefe *Raffinia rhodozyma*, das marine Bakterium *Agrobacterium aurantiacum* und verschiedene Grünalgen, einschließlich *Haematococcus* sp., *Neochloris wimmeri* und *Chlamydomonas nivalis*. *Haematococcus pluvialis* ist die reichste Quelle an natürlichem Astaxanthin und wird bereits in industriellem Maßstab kultiviert (Domínguez-Bocanegra *et al.* 2007). Das Carotinoidpigment Astaxanthin hat unter anderem wichtige Einsatzmöglichkeiten in der nutraceutischen, kosmetischen und Lebensmittelindustrie.

Die Grünalge *Haematococcus pluvialis* ist ein einzelliger, im Süßwasser lebender Biflagellat. Sie besitzt einen mehrteiligen Lebenszyklus, der zwei distinkte Stadien enthält. Unter optimalen Bedingungen sind die Zellen biflagellat begeißelt, kugelförmig oder ellipsoid und von einer Zellwand umgeben. Unter Licht-,

Temperatur- oder Salzstress erfolgt eine Transformation in ein Aplanosporenstadium, währenddessen sich die Zellen rot verfärben, was auf die Akkumulation von Astaxanthin in freien Lipidtröpfchen im Cytoplasma zurückzuführen ist. Ein weiteres Merkmal der Aplanosporen ist ihre dicke Zellwand, die eine Extraktion von z.B. Pigmenten erschwert. Eine Rücktransformation in das vegetative Stadium ist bei Ausschalten der Stressbedingungen möglich. Es ist bekannt, dass *H. pluvialis* bis zu 4% seines Trockengewichts an Astaxanthin produzieren kann. Eine effiziente Produktion an Astaxanthin durch *H. pluvialis* im Freien ist jedoch schwierig, da diese Alge nur eine geringe Wachstumsrate aufweist und anfällig für Kontaminationen ist (Hata et al. 2001). Im Jahr 2000 betrug der Marktwert von Astaxanthin rund 2500 US\$ je kg mit einem jährlich geschätzten Absatzmarkt von rund 200 Millionen US\$. Obwohl über 95% dieses Umsatzes mit synthetisch hergestelltem Astaxanthin getätigt wurden, wird vom Verbraucher das natürliche Produkt bevorzugt (Lorenz und Cysewski 2000). Es ist möglich, dass das chemisch synthetisierte Astaxanthin, auch 3,3'-Dihydroxy-β-β-Carotene-4,4'-Dion genannt (siehe Abb. 1), unnatürlich konfigurierte Carotinoidkomponenten besitzt, womit es eine verminderte Wirkung verglichen mit seinem natürlichen Gegenpart hat (Kaewpintong et al. 2007).

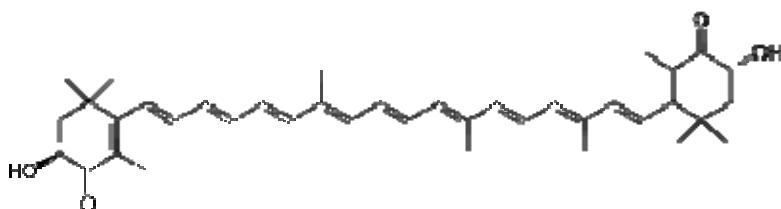


Abbildung 1: Strukturformel von Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy-β-β-Carotene-4,4'-Dion)  
(Britton et. al 2004)

In seinem natürlichen Habitat kommt *H. pluvialis* häufig in eingetrockneten Dachrinnen, Felsenmulchen oder Regenpfützen vor. Da die Zellen diese Orte mit einer roten Vegetationsschicht überziehen, wird dieses auffallende biologische Phänomen als „Blutregen“ bezeichnet (Czygan 1970).

Generell begünstigen die Bedingungen für eine hohe Wachstumsrate nicht die Akkumulation von Astaxanthin in *H. pluvialis*. Daher haben einige Wissenschaftler eine Zwei-Phasen-Anzuchtmethode angewendet, bei der die Algen zunächst unter optimalen Wachstumsbedingungen zur Biomasseproduktion angezogen werden und anschließend eine Induktion der Astaxanthinproduktion durch Stress erfolgt (Hata

et al. 2001). Andere Forscher versuchten gleichzeitig sowohl die Wachstumsrate, als auch die Akkumulation von Astaxanthin zu maximieren (Del Río und Acién 2007). Ein oft beschriebener Stressfaktor, der die Astaxanthinbiosynthese induziert, ist Licht. Dabei spielt scheinbar sowohl die quantitative Lichtintensität, als auch die qualitative Verteilung des Spektrums eine wichtige Rolle. So wird berichtet, dass blaues Licht effektiver für die Astaxanthinakkumulierung ist, als rotes (Steinbrenner und Linden 2003). Es gibt beachtliche Unterschiede bei der Empfehlung der optimalen Lichtintensität zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate von *H. pluvialis* in der Literatur. Die Werte für den Photonenstrom schwanken zwischen 30 und 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Kang et al. 2007). Daher soll das Ziel dieser Arbeit darin bestehen, den Einfluss der Lichtintensität auf die Akkumulation von Astaxanthin in *H. pluvialis* Zellen zu determinieren.

Aufgrund des geringen Wachstums, der Anfälligkeit für Kontaminationen und der Bevorzugung niedriger Temperaturen hat sich die Anzucht von *H. pluvialis* im Freien bisher als ineffizient erwiesen. Dies machte die Verwendung eines geschlossenen Systems notwendig, was auch eine Reihe von Vorteilen mit sich bringt, wie z.B. eine bessere Kontrolle der Kulturbedingungen, den Schutz vor möglichen Kontaminationen und das Erreichen von hohen Zelldichten (Kaewpintong et al. 2007).

Ziel dieser Arbeit sollte zunächst die Konstruktion eines zur Algenanzucht geeigneten Bioreaktors sein, um anschließend mit diesem die Versuche zur Untersuchung der Wachstumsbedingungen durchzuführen. Bei diesen sollte wiederum der Einfluss der Lichtintensität auf das Wachstum und die Produktion von Astaxanthin bei der Grünalge *Haematococcus pluvialis* determiniert werden.

## 2 Hypothese

Aufgrund der Vermutung, dass Astaxanthin die Zellen von *H. pluvialis* vor photooxidativem Stress schützt, soll die folgende Hypothese geprüft werden: Mit zunehmender Lichtintensität akkumuliert die Grünalge *H. pluvialis* schneller das Sekundärcarotinoid Astaxanthin.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Photobioreaktor

##### 3.1.1 Aufbau des Photobioreaktors

Zur Anzucht der Algen fand ein eigens dafür konstruierter Airlift-Photobioreaktor Verwendung, der den Namen ZaKi 2.0 trägt. Dieser wurde zusammen mit Serge Zagermann entworfen und gebaut. Es handelt sich dabei um das Nachfolgemodell des ZaKi 1.0, der bei einem Vertiefungspraktikum im Institut für biologische Produktionssysteme – Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik der Leibniz Universität Hannover angefertigt wurde. Zur verbesserten Vorstellung ist in Abbildung 2 ein Modell des ZaKi 2.0 dargestellt. Das Grundgerüst stellt ein aus dem MetaFix-Regalsystem der Firma Meta (Arnsberg, Deutschland) angefertigtes Gestell dar, welches den Vorteil einer schnellen Modifikationsmöglichkeit durch den Anbau neuer Bauelemente in sich birgt.

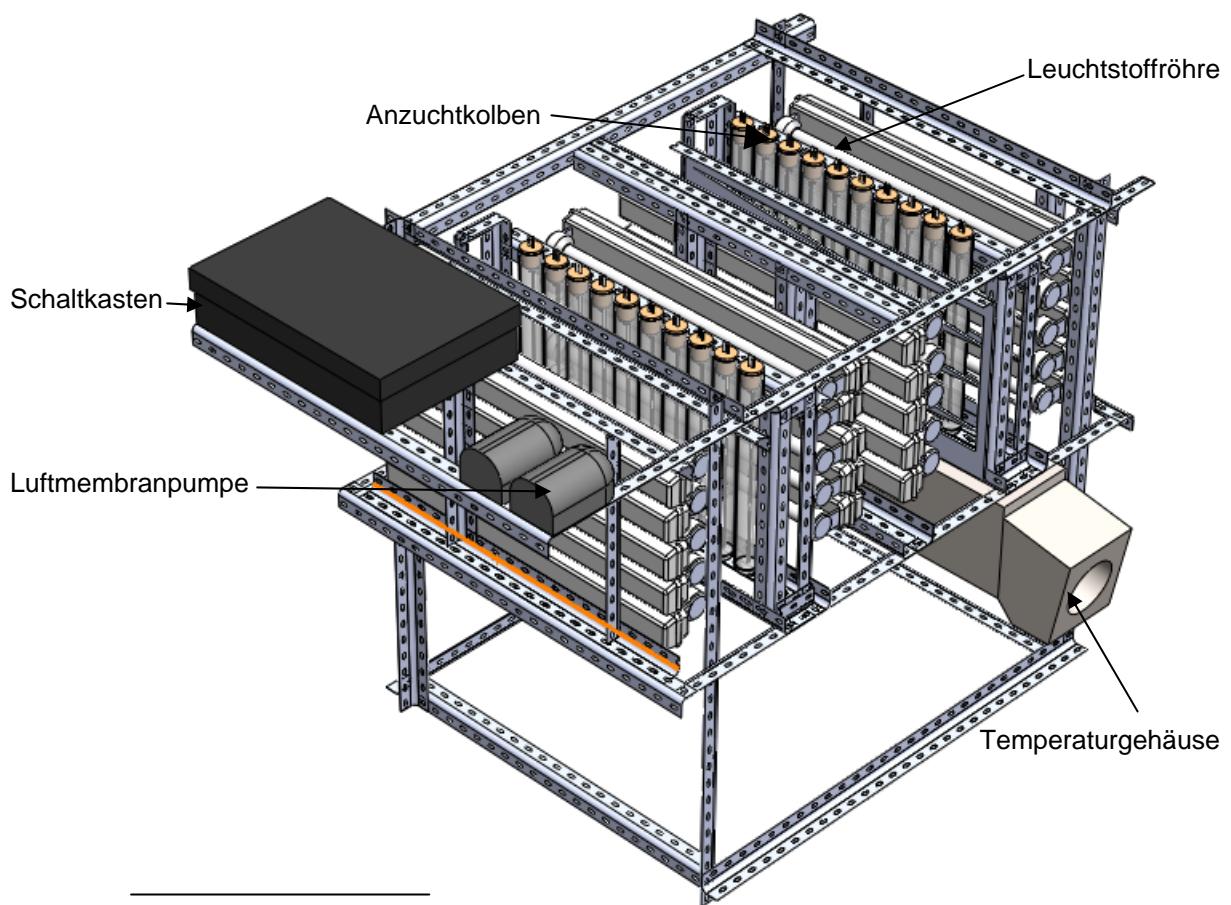


Abbildung 2: Konstruktionsmodell des ZaKi 2.0 (schwarze Linie entspricht 0,5 m)

Der Photobioreaktor besteht aus zwei separat zu betreibenden Anzuchtsystemen, in denen sich jeweils 10 Glaskolben (Jürgen Pfeuffer Laborbedarf Hannover) mit einem Füllvolumen von 300 ml nebeneinander befinden. Diese Glaskolben sind nach oben hin mit Silikonstopfen verschlossen, die wiederum mit zwei Glasrohren durchstochen sind, eines bis zum Kolbenboden reichend zur Luftzufuhr und ein kürzeres zur Luftabfuhr (siehe Abb. 3). Die Begasung erfolgt für jedes einzelne Anzuchtsystem durch je eine Luftpumpe der Firma Selinger, die eine Pumpleistung von 24-84 L h<sup>-1</sup> besitzt, mit Raumluft, welche zuvor durch destilliertes Wasser geleitet und somit angefeuchtet wird, um das Füllvolumen in den Kolben konstant zu halten. Die Belüftungsstärke ist mit vorgeschalteten Schlauchsperren (Rotilabo) manuell verstellbar. Durch Auszählen der Luftblasen kann eine gleiche Belüftungsstärke für alle Kolben eingestellt werden. Vor jedem Kolben wurde ein Sterilfilter (Sartorius, 0,22 µm Porengröße) angebracht, um eine Kontamination der Proben durch die Raumluft zu vermeiden.

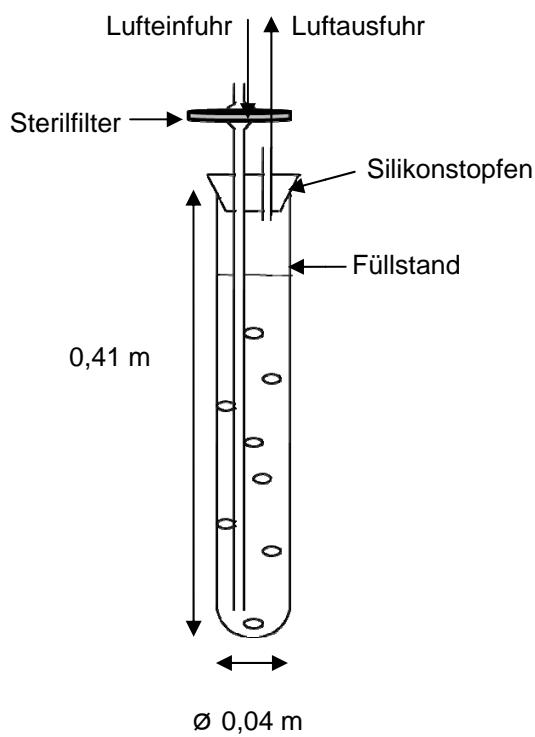


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Anzuchtkolbens

An beiden Querseiten eines jeden Anzuchtsystems wurden jeweils 5 Leuchtstoffröhren horizontal montiert. Die Auswahl der Leuchtstoffröhren erfolgte unter Berücksichtigung einer größtmöglichen Abdeckung der relativen Photosynthesewirkung innerhalb der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR). Unter dieser Vorgabe fanden daher folgende Leuchten Verwendung: Osram Lumilux 830 (warm white), Osram Lumilux 865 (cool day-light) und Repitsun 10.0 UVB. Diese wurden alternierend an der inneren Seite zu den Glaskolbenreihen hin angebracht. Die relative Photosynthesewirkung im PAR-Bereich konnte trotz der gezielten Auswahl der Leuchten dabei nicht vollständig abgedeckt werden (siehe Abb. 4).

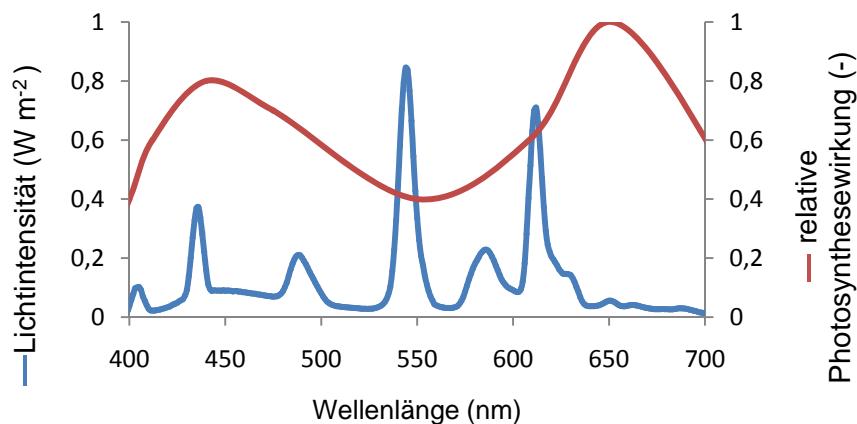


Abbildung 4: Spektraler Strahlenfluss der eingesetzten Leuchtstoffröhren innerhalb der Kolben im PAR-Bereich und Spektrum der Photosynthesewirkung nach DIN 5031-10, 2000

Eine Messung der Lichtintensität in den Kolben ergab einen Gradienten, sowohl in den einzelnen Kolben bei unterschiedlichen Höhen, als auch zwischen den einzelnen Kolben. Dieser Gradient ist in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Lichtintensität von außen nach innen um den Faktor 2 zunimmt. Daher muss der Faktor Licht bei der Untersuchung anderer Wachstumsfaktoren immer als Kovariable mit berücksichtigt werden.

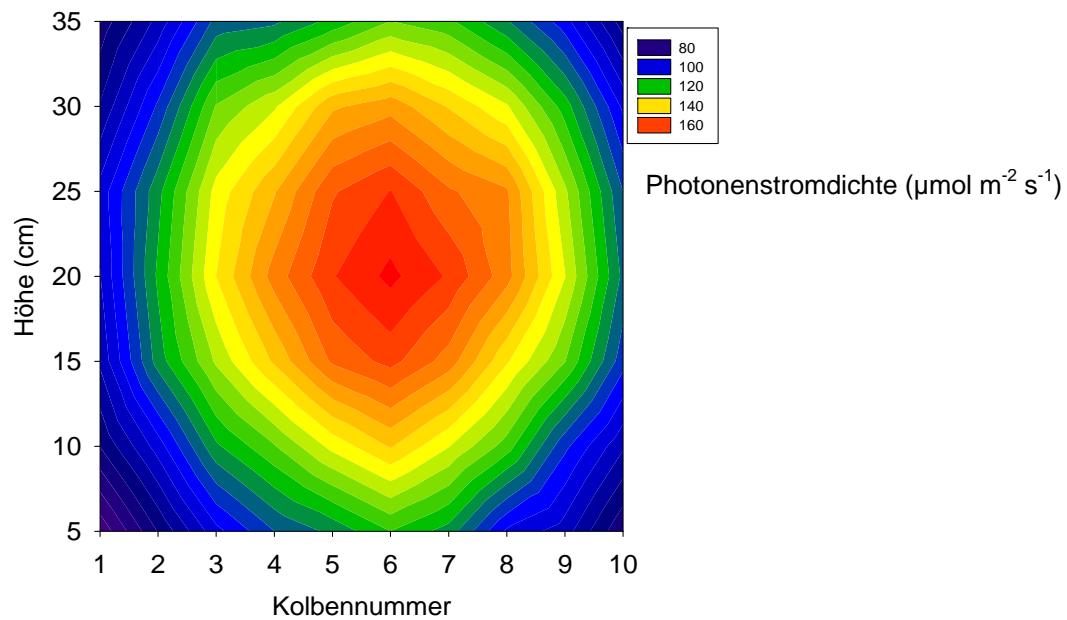


Abbildung 5. Verteilung der Lichtintensität in den Kolben

### 3.1.2 Kalibrierung der Temperaturfühler

Um die genauen Versuchsbedingungen, insbesondere den Temperaturverlauf, zu erfassen, wurden 3 NTC-(negative temperature coefficient) Temperaturfühler an die Kolben angebracht. Damit diese nicht von der Strahlung der Lampen beeinflusst wurden, wurden sie zusätzlich mit Styropor verkleidet. Um nun von der gemessenen Temperatur am äußeren Kolbenrand auf die Temperatur im Inneren der Kolben schließen zu können, wurden die Temperatursensoren (SEMI 833 ET, Hygrosens Instruments GmbH, Löffingen) mit einem Präzisionsthermometer kalibriert. Eine derartige Kalibriergerade ist in Abbildung 6 zu sehen. Von der sich daraus berechneten Funktion der Regressionsgerade lässt sich die Temperatur im Inneren der Kolben durch Messen am äußeren Kolbenrand bestimmen und aufzeichnen.

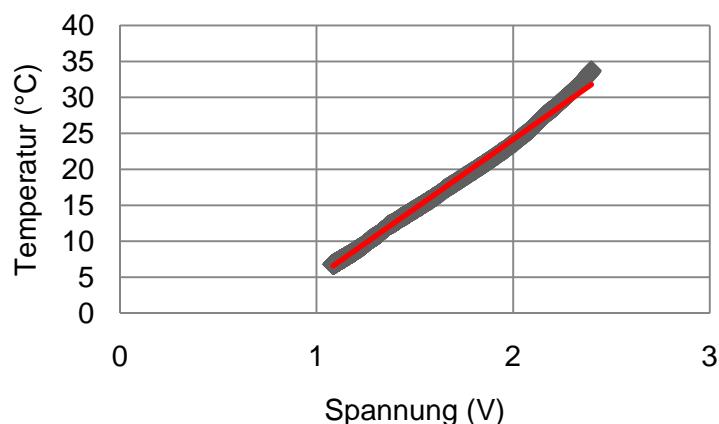


Abbildung 6. Kalibrierkurve mit Regressionsgerade für Temperaturfühler 4

### 3.1.3 Mess- und Regelungstechnik des Photobioreaktors

Um die Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, ist es unerlässlich die Algen unter gleichbleibenden Bedingungen anzuziehen. Hierfür wurde ein Regelungssystem erstellt, das es erlaubte, die Algen unter konstanten Temperaturbedingungen zu kultivieren. Zu diesem Zweck wurde unter den Kolben ein Gehäuse angebracht, das zwei gegenüberliegende Wärmetauscher zur Beheizung und zwei Lüfter zur Kühlung enthielt. Dadurch entstand ein temperierter Luftstrom der von unten die Anzuchtkolben umströmte. Die Elemente wurden über ein eigens dafür erstelltes Computerprogramm angesteuert. Das Programm wurde mit der Software ProfiLab Expert 4.0 (ABACOM Ingenieurbüro GbR, Ganderkesee) kompiliert, sodass eine Stand-Alone-Anwendung vorlag, die auf jedem Windows-PC ohne die Originalsoftware gestartet werden kann. Als Verbindungselement zwischen dem PC und den Messsensoren wurde ein LabJack U12, ein externes USB Interface mit mehreren analogen und digitalen Ein- und Ausgängen, zwischengeschaltet. Dieses ermöglichte die Umwandlung der analogen Spannung aus der Temperaturmessung in digitale Daten. Diese digitalen Daten aus den Temperaturfühlern wurden nach dem Schema in Abbildung 7 weiterverarbeitet.

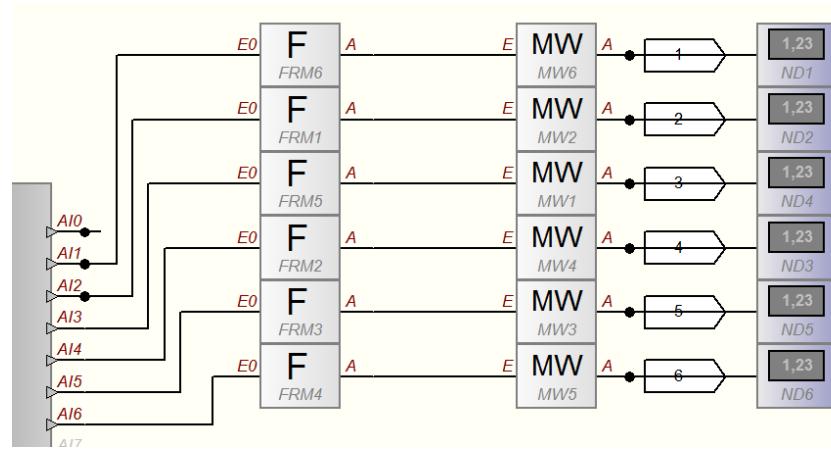


Abbildung 7: Darstellung der Bauelemente innerhalb des Programms ProfiLab Expert 4.0 zur Weiterverarbeitung der Temperaturdaten. F- Funktion zur Umrechnung der Daten von mV in °C, MW – Mittelwertbildung über eine Minute, ND-Display zur Visualisierung auf der grafischen Benutzeroberfläche

Zunächst erfolgte die Umrechnung der Spannungswerte mit den zuvor ermittelten Gleichungen aus den Kalibriergeraden der Temperatursensoren in die Einheit °C. Diese sekündlich aufgezeichneten Daten wurden über eine Minute gemittelt und aufgenommen.

Das zentrale Steuerelement der Bedienungssoftware stellte der Bereichsprüfer (siehe Abb. 8) dar. Mit diesem Element ließ sich prüfen, ob der gemessene Temperaturwert zwischen der unteren festgelegten Temperaturgrenze und der oberen lag. Bei einer Überschreitung ging der erste Ausgang auf logisch 1, bei einer Unterschreitung der zweite Ausgang auf logisch 1. Somit konnte mit dem ersten Ausgang die Lüftung angesteuert werden und mit dem zweiten Ausgang die Heizung. Es musste jedoch die Lüftung auch eingeschaltet werden, wenn die Heizung aktiviert war, da sich sonst die aufgeheizte Luft in dem Temperaturgehäuse angesammelt hätte und das Heizelement durchgebrannt wäre. Aus diesem Grund wird die Lüftung sowohl beim Über-, als auch bei Unterschreiten der Solltemperatur angeschaltet. Als Isttemperatur diente der Mittelwert der drei Temperaturfühler eines Anzuchtsystems.

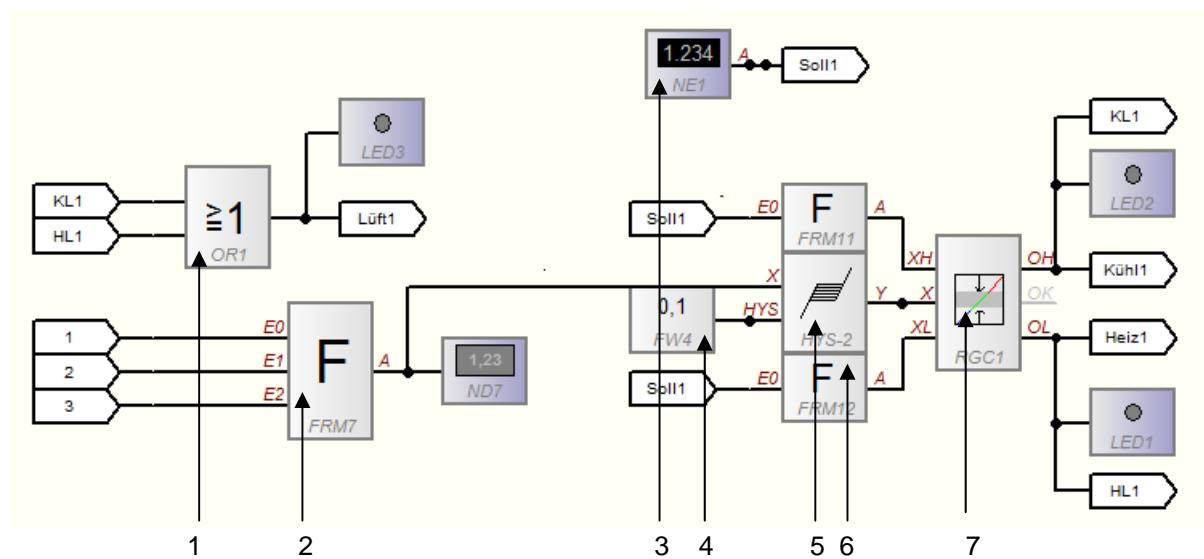


Abbildung 8: Darstellung der Bauelemente im Programm ProfiLab Expert 4.0 zur Temperaturregelung.  
 1-Logische Oder-Funktion zur Regelung der Lüftung, 2-Funktion zur Mittelwertbildung der drei Temperaturfühler, 3-Display zur Eingabe der Solltemperatur, 4-Regelabweichung von 0,1 °C, 5-Spiel zur Regelabweichung, 6-Funktion zur Verrechnung des Sollwertes, 7-Bereichsprüfer

Mit Hilfe einer im Regelungsprogramm implementierten Zeitschaltuhr konnte ebenfalls die Bedienung der Lampen gesteuert werden (siehe Abb. 9). Auf der grafischen Benutzeroberfläche wurden die Messwerte der einzelnen

Temperaturfühler und die Mittelwerte für beide Anzuchtsysteme angezeigt und im Diagramm nach der Zeit aufgezeichnet. Die Solltemperatur konnte im Benutzerinterface festgelegt werden. Die Leuchtdioden zeigten an, ob die Gräte an oder ausgeschaltet waren, womit eine stetige Kontrolle über deren Funktionalität möglich war.

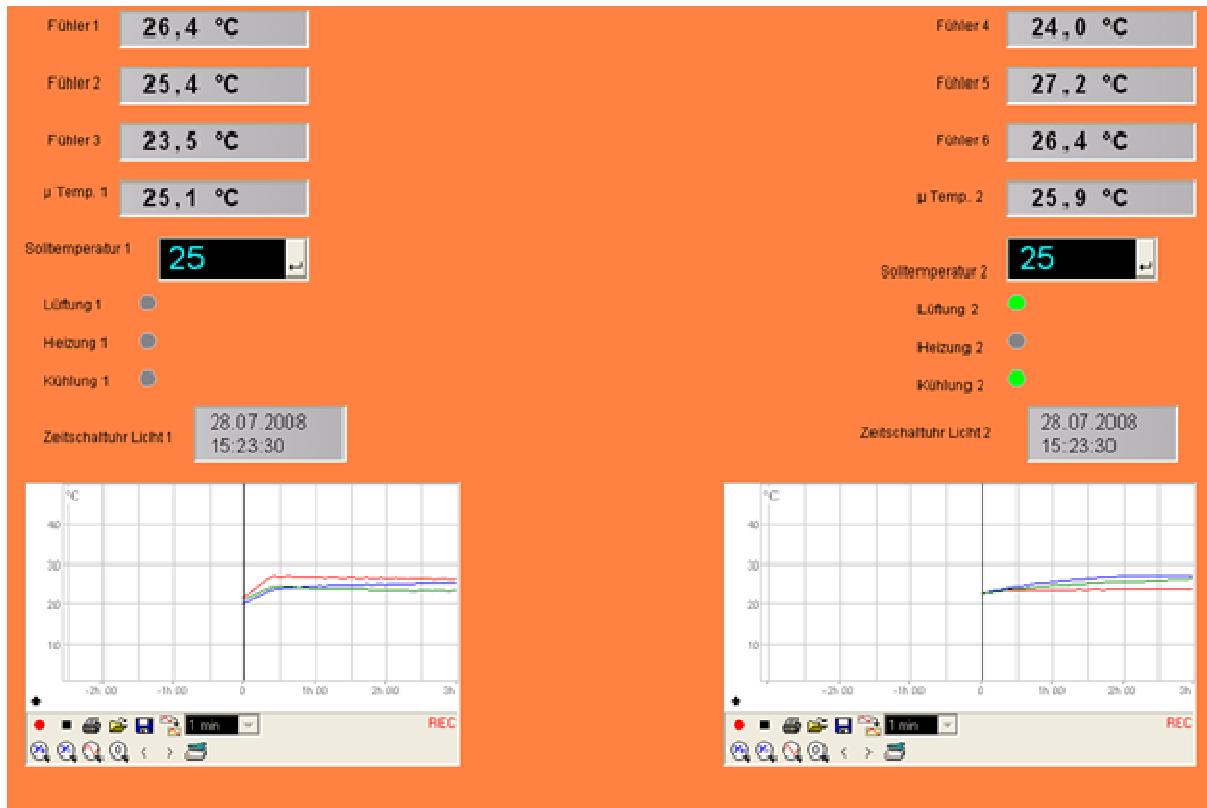


Abbildung 9: Grafische Benutzeroberfläche zur Regelung des ZaKi 2.0.

### 3.1.4 Analytische Verfahren

Zur Bestimmung der Wachstumsparameter wurde den Kolben jeweils 1 ml Algen entnommen. Diese wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Ermittlung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllkonzentration musste zunächst ein geeignetes Verfahren zum Zellaufschluss ermittelt werden. Hierfür wurde je ein Zellpellet für 10 Minuten bei 70 °C in 1 ml Methanol, Aceton, DMSO sowie für 5 Minuten in DMSO gelöst. Als eine weitere gängige Aufschlussmethode wurde eine French Press verwendet. Zu diesem Zweck mussten zunächst zur Bestimmung der Zelldichte der Algensuspension zweimal fünf Milliliter Algenkultur in Hematokritröhren für zehn Minuten zentrifugiert werden. Aus der errechneten Zelldichte in Mikroliter Algensuspension pro Milliliter Medium wurde die Menge an benötigtem 10 millimolarem Phosphatpuffer ermittelt, in dem die Algen resuspendiert wurden. Das

gelöste Algenpellet wurde in eine vorgekühlte French-Press (American Instruments Company, Silver Spring, Maryland) gegossen. Der Ablauf wurde zweimal bei einem Druck von rund 10,34 MPa durchgeführt und das Zellhomogenat unter dem Mikroskop bei einer vierzigfachen Vergrößerung betrachtet. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch im benötigten Probenvolumen, welches für eine tägliche Messung zu groß ist. Nachdem die optimale Prozedur ermittelt wurde, wurde das Algenpellet in 1 ml DMSO resuspendiert und für 10 Minuten bei 70°C im Wasserbad gelöst. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung mit einem Spektralphotometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, Maryland, USA) bei 665 nm zur Bestimmung der Wachstumsparameter, bei 663 nm und 644 nm zur Chlorophyllbestimmung und bei 452,5 nm zur Carotinoidbestimmung. Die gleichzeitige Bestimmung von Chlorophyllen und Carotinoiden erfolgte nach den Formeln (1) (Barnes *et al.* 1992) und (2) (Röbbelen 1957).

$$\text{Chlorophyllgehalt (mg L}^{-1}) = 17,9 \cdot \text{Abs. (665 nm)} + 20,34 \cdot \text{Abs. (648 nm)} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Carotinoidgehalt (mg L}^{-1}) = & 4,76 \cdot \text{Abs. (452,5 nm)} - 0,226 \cdot (10,3 \cdot \text{Abs. (663 nm)} - \\ & 0,918 \cdot \text{Abs. (644 nm)} + 19,7 \cdot \text{Abs. (644 nm)} - 3,87 \cdot \\ & \text{Abs. (663 nm)}) \end{aligned} \quad (2)$$

Um aus der Absorptionsmessung bei 665 nm auf die Trockenmasse schließen zu können, wurden zweimal 1 ml gleiche Algenproben entnommen und mit einer Probe die oben beschriebene Absorptionsmessung bei 665 nm durchgeführt und die andere Probe für 12 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Mit Hilfe einer Regressionsanalyse wurde anschließend die lineare Beziehung dargestellt.

Um zu kontrollieren, ob der pH-Wert der Algensuspension im neutralen Bereich lag, wurde dieser mit einem pH-Teststreifen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) ermittelt.

Zur quantitativen und qualitativen Analyse der Carotinoide wurden nach 12 Tagen Wachstum 50 ml der Algensuspension abgeerntet und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Algenpellet abgewogen. Jeweils 100 mg Frischgewicht der Algenpellets wurden anschließend aufeinanderfolgend in 300 ml, 100 ml und 100 ml DMSO gelöst und die Überstände zusammengeführt. Die Lösung wurde daraufhin

mittels HPLC (high performance liquid chromatography) analysiert. Das Trennsystem der verwendeten HPLC-Analyse setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: eine Pumpeneinheit (Smartline Pump 100, Knaur), ein Photodiodenarraydetektor (PDA) (Smartline PDA Detector 2800 UV, Knaur) und ein Autosampler (Smartline Autosampler 3800, Knaur). Die Steuerung der Komponenten sowie die Aufzeichnung der Daten erfolgt über einen PC unter Verwendung der ChromGate-Software (scientific software inc.). Die Pigmenttrennung verlief auf einer reversed-phase-Säule des Typs LiChospher 100.

Eine Gradientenmethode fand Verwendung, bei der Laufmittel A (750 ml Acetonitril, 80 ml Methanol, 60 ml TRIS/HCl 0,1 M (pH 8,0)) und Laufmittel B (800 ml Methanol, 200 ml Hexan) nach dem Schema in Tabelle 1 eingesetzt wurden. Die Flussrate betrug konstant 1 ml min<sup>-1</sup>.

Tabelle 1. Zur Pigmenttrennung eingesetzter HPLC-Gradient.

Zeit (min)	Laufmittel A (Vol%)	Laufmittel B (Vol%)
0	100	0
7	100	0
13	0	100
20	0	100
20,1	100	0
24	100	0

Die Aufzeichnung der Spektren durch den PDA-Detektor wurde im Wellenlängenbereich von 300 bis 520 nm durchgeführt. Um den Astaxanthingehalt bestimmen zu können, wurde eine Astaxanthinstammlösung von 100 µg ml<sup>-1</sup> hergestellt und nach folgendem Schema zu einer Eichreihe verdünnt: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 und 25 µg ml<sup>-1</sup>. Außerdem wurden von einigen Proben Doppelansätze analysiert und weitere mit einem Astaxanthinstandard von 10 µg angereichert, um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse des Systems zu testen.

## 3.2 Der Versuch

### 3.2.1 Algenstamm

Als Versuchsobjekt diente der *Haematococcus pluvialis* Flotow Algenstamm 34-1a aus der Sammlung von Algenkulturen an der Universität Göttingen. Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen in mit Wattestopfen verschlossenen 200 ml Erlenmeyerkolben als Stammlösung auf einem Schüttler bei 100 U min<sup>-1</sup> mit einer Photonenstromdichte von 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im 16 h Tag/ 8 h Nacht-Rhythmus angezogen. Als Kulturmedium fand Bold's-Basal-Medium Verwendung, das sich aus den Komponenten in den Tabellen 2 und 3 zusammensetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung von  
Bold's-Basal-Medium

Nährstoff	Stammlösung
NaNO <sub>3</sub>	25g
MgSO <sub>4</sub>	7,5 g
NaCl	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •3H <sub>2</sub> O	7,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5 g
CaCl <sub>2</sub> •H <sub>2</sub> O	2,5 g
H <sub>2</sub> O	836 ml
Mikronährstoffe	10 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung der Mikroelemente

Nährstoff	Stammlösung Menge pro Liter	Verwendete Menge
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8,82 g	1 ml
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	1,44 g	1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1,14 g	1 ml
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,49 g	1 ml
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	1,57 g	1 ml
MoO <sub>3</sub>	0,71 g	1 ml
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	4,98 g	1 ml
EDTA	5 g	1 ml
KOH	3,1 g	1 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ml	1 ml

### 3.2.2 Versuchs-Set-up

In insgesamt 10 Kolben wurden jeweils 250 ml Bold's-Basal-Medium und 50 ml Algenstammlösung, die eine optische Dichte (665 nm) von 0,2 aufwies, gefüllt. Zur Verhinderung einer Kontamination wurden sowohl die Kolben, als auch das Medium zuvor autoklaviert. Da sich in dem Medium keine externen energieliefernden Komponenten befanden, fand die Anzucht der Algen unter photoautotrophen Bedingungen statt. Die Algen wurden 12 Tage lang im ZaKi 2.0 angezogen, weil es sich in Vorversuchen zeigte, dass sich *H. pluvialis* unter hoher Einstrahlung stark rot verfärbte. Da für das Ziel der Versuche die Abhängigkeit des Wachstums und der Produktion an Astaxanthin von der Photonenstromdichte zu determinieren war,

wurden vor den Kolben Metallplatten nach dem Schema in Abbildung 10 angebracht, um einen Lichtgradienten zu erzeugen.

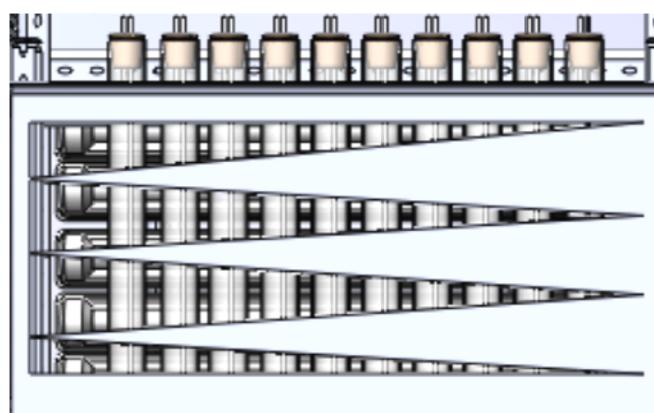


Abbildung 10: Ansicht auf die Kolben im Modell es ZaKi 2.0 mit Metallblechen zur Lichtabschirmung  
(Kolben 1 links außen, Kolben 10 rechts außen)

Damit wurden die Algen unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt. Eine Lichtmessung in den Kolben ergab eine Verteilung der Lichtintensität, wie sie in Abbildung 11 visualisiert ist. Der Gradient zeigt einen logarithmischen Werteanstieg von Kolben Nummer 10 bis Kolben 1 ansteigend.

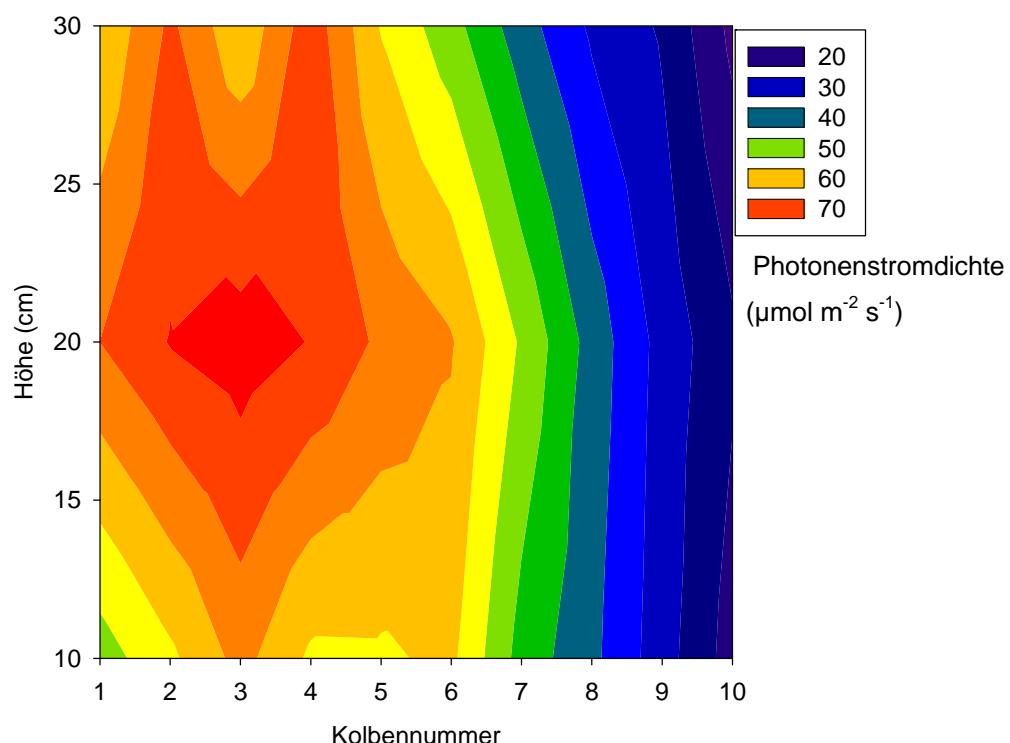


Abbildung 11: Verteilung der Lichtintensität innerhalb des Photobioreaktors in den Kolben, die mit vormontierten Metallblechen abgeschirmt wurden.

Acht der zehn Kolben bestanden aus normalem Fensterglas, wohingegen Kolben 3 und 8 aus Quarzglas bestanden, womit eine Durchlässigkeit im UV-Bereich gewährleistet werden sollte.

Die Begasung erfolgte mit Raumluft bei einer Begasungsrate von 0,22 Liter Raumluft pro Minute je Kolben. Als Anzuchtemperatur wurden 25 °C gewählt, da für *H. pluvialis* bei dieser Temperaturstufe die höchsten Wachstumsraten festgestellt wurden (Hata *et al.* 2001). Die Belichtung wurde mit einem 16 h Tag/ 8 h Nacht-Rhythmus durchgeführt wobei die Tagesphase von 5.00 Uhr bis 21.00 Uhr dauerte.

### 3.2.3 Versuchsdurchführung

Es wurden täglich von jedem Kolben 1 ml Probevolumen mit einer mit einem Schlauch, der in das Luftaustrittsrohr geschoben wurde, verlängerten Spritze entnommen. Diese Proben wurden anschließend mittels der oben beschriebenen Untersuchungen analysiert. An dieser Stelle soll noch darauf hingewiesen werden, dass diese Art der Probenentnahme nicht steril ist und eine Kontamination der Proben dadurch nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Zellzahlbestimmung wurde nur während der ersten und zweiten Wiederholung durchgeführt, um mit diesen Daten einen linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und optischer Dichte herzustellen. Die HPLC Analysen wurden nach 12 Tagen Kulturführung mit den abgeernteten *H. pluvialis* Zellen durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Es war rein optisch zu erkennen, dass sich die Algen während der zwölfjährigen Wachstumsperiode vom grünen Stadium ins rote verfärbten (siehe Abb. 12).

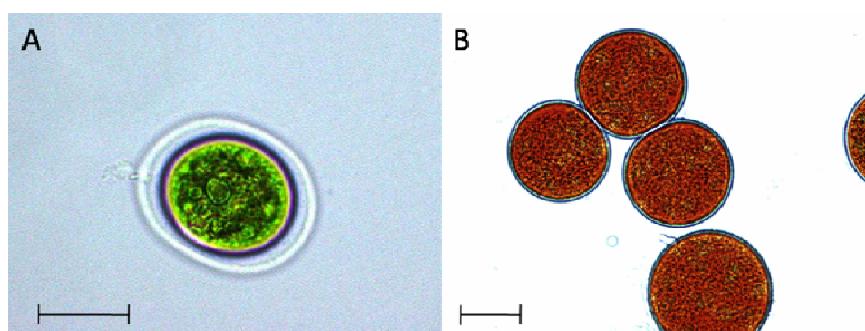


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme von *H. pluvialis* Zellen. (A) grüne vegetative Zellen, (B) rotgefärbte Aplanosporen (Balken entsprechen jeweils 25 µm)

Im Verlauf der Anzucht kam es bei einigen Kolben zu Kontaminationen, die daraufhin für die spätere Versuchsauswertung nicht weiter berücksichtigt wurden. Dies machte sich durch eine gelbe Färbung und ein Verklumpen der Algen bemerkbar (siehe Abbildung 13).

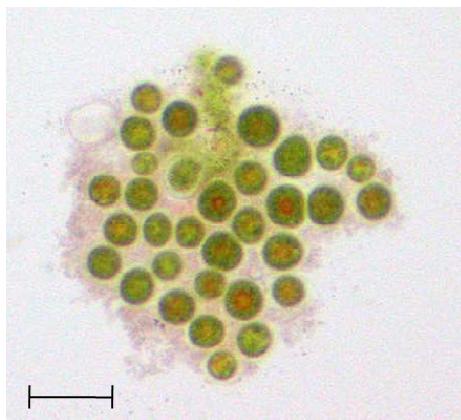


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme  
kontaminiertes Algensuspension  
von *H. pluvialis* (Balken entspricht  
100 µm)

Des Weiteren war auffällig, dass sich die Algen immer wieder am Boden der Kolben absetzten. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass das Glasrohr zur Luftzufuhr nicht bis zum Korbgrund reichte und dadurch im unteren Kolbenbereich die Zirkulation für ein Aufschwemmen der Algen nicht genügte. Auch bei maximal möglicher Belüftungsstärke konnte dieser Umstand nicht beseitigt werden. Zusätzlich setzten sich einige Algen am oberen Rand der Kolben ab. Dies wurde durch die teilweise ruckartigen Auf- und Abbewegungen des Füllstandes aufgrund der großen Luftblasen hervorgerufen. Das Anbringen eines Sprudelsteins (Selinger) am unteren Ende des Luftzufuhrrohrs, der die Luftblasen zerkleinerte, konnte keine Abhilfe schaffen, da dieser durch absinkende Algen verstopft wurde. Deshalb konnte diesen beiden Phänomenen nur durch ein tägliches manuelles Schwenken der Kolben entgegengewirkt werden.

#### 4.1 Zellauflösung

Zur Ermittlung einer Extraktionsmethode zur Pigmentanalyse aus den *H. pluvialis* Zellen wurde die Extraktion mittels Aceton, Methanol, DMSO, French Press und Wasser als Kontrolle analysiert. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, konnten mittels Aceton die Zellen nicht aufgeschlossen werden. Die Zellen verformten sich lediglich und zogen sich zusammen. Methanol hatte keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Es erfolgte keine Freisetzung der Pigmente. Durch Dimethylsulfoxid

(DMSO) ist eine erfolgreiche Extraktion möglich. Nach 5 Minuten sind die Pigmente aus den Zellen zumindest teilweise gelöst, nach 10 Minuten ist die Extraktion vollständig. Die Zellreste sind farblos, was darauf hinweist, dass sich die Pigmente im Lösungsmittel befinden. Der Zellaufschluss mit der French Press war ebenfalls erfolgreich. Die Zellwände wurden augenscheinlich aufgebrochen. Für eine tägliche Probenanalyse ist es jedoch aus oben genannten Gründen unmöglich die Proben mittels French Press aufzuschließen. Die Wasserkontrolle zeigt keinerlei Veränderungen der *H. pluvialis* Zellen. Da sich die Extraktionsmethode mit DMSO als am effektivsten erwiesen hat, wurden daher alle Pigmentextraktionen nachfolgend mit dieser Methode durchgeführt.

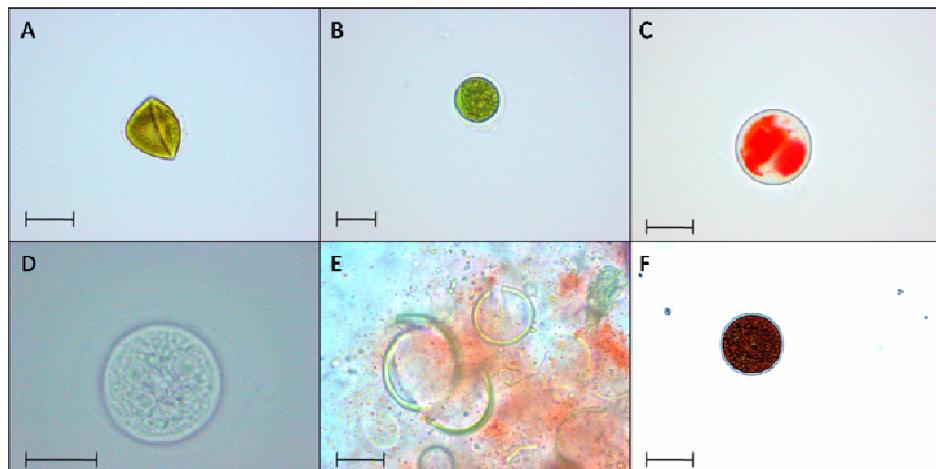


Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahmen der mit Lösungsmitteln behandelten *H. pluvialis* Zellen. (A) Behandlung mit Aceton, (B) mit Methanol, (C) mit DMSO für 5 Minuten, (D) mit DMSO für 10 Minuten, (E) French Press, (F) mit Wasser

## 4.2 Biomasseproduktion

Um den Zusammenhang zwischen dem Trockenmasse und der optischen Dichte (665 nm) zu ermitteln, wurden von mehreren Proben sowohl die Konzentration der Trockenmasse ( $\text{g ml}^{-1}$ ), als auch die dazugehörige optische Dichte ermittelt und die Daten einer Regressionsanalyse unterzogen.

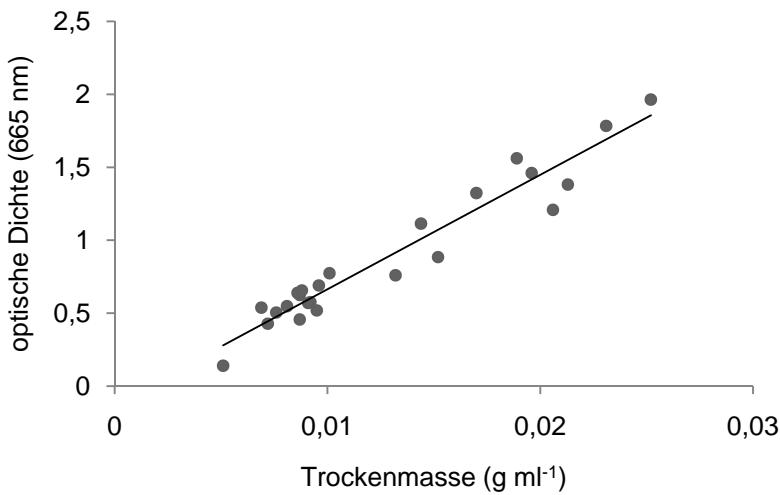


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen der optischen Dichte (665 nm) und der Trockenmasse ( $\text{g ml}^{-1}$ ) mit Hilfe einer Regressionsgeraden

Es ergab sich eine Regressionsgerade mit einem Anstieg von 78,42 (siehe Abb. 15). Das angepasste Modell wies ein adjustiertes Bestimmtheitsmaß von 0,9311 und einen Vorhersagefehler von  $0,13 \text{ g ml}^{-1}$  auf.

Zur Ermittlung der Anzahl der Zellen pro Milliliter wurde beim ersten und zweiten Versuch neben der optischen Dichte bei 665 nm auch die Zellzahl mittels Haematocytometer bestimmt. Die sich daraus ergebende Regressionsgerade ist in Abbildung 16 dargestellt.

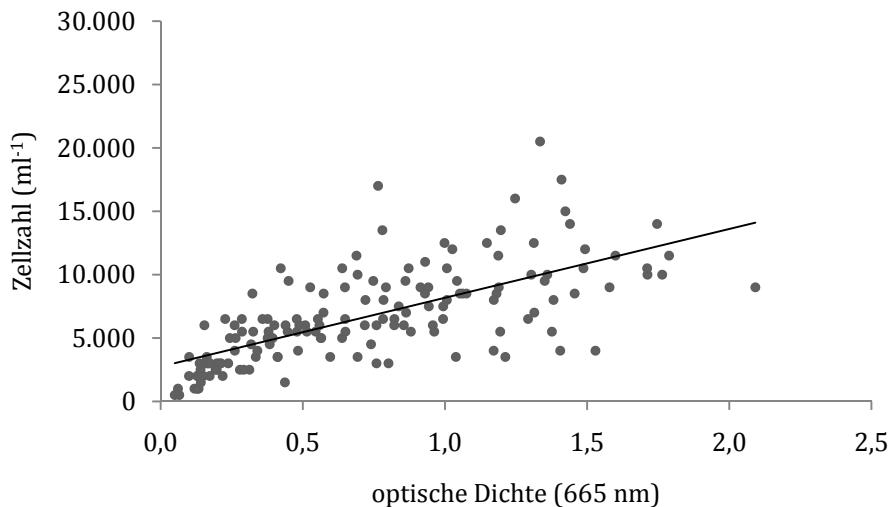


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Zellzahl und optischer Dichte (665 nm) mit zugehöriger Ausgleichsgerade

Für das gefittete Modell ergaben sich ein Restfehler von 2822,85 Zellen pro Milliliter und ein adjustiertes Bestimmtheitsmaß von 0,46.

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Lichtintensitäten und die UV-Bestrahlung überhaupt einen Einfluss auf die Biomasseproduktion, den Chlorophyll- oder den Carotinoidgehalt haben, wurde zunächst eine ANOVA (Analysis of Variance) mit den Endkonzentrationen am 12. Tag durchgeführt. Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass lediglich der Faktor Lichtintensität einen signifikanten Einfluss auf die Endkonzentration an Biomasse, sowie den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt in den Kolben hat, da die p-Werte kleiner als 0,05 sind. Sowohl die UV-Bestrahlung, als auch die Interaktion zwischen Lichtintensität und UV-Bestrahlung weisen keinen signifikanten Einfluss auf, denn hier liegen die p-Werte über 0,05.

#### Analysis of Variance Table

```

Response: Carotinoidgehalt
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Licht     1 16.7000 16.7000  8.8848 0.01147 *
UV        1  1.3849  1.3849  0.7368 0.40751
Licht:UV   1  2.4762  2.4762  1.3174 0.27343
Residuals 12 22.5554  1.8796

Response: Chlorophyllgehalt
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Licht     1 67.692  67.692 11.0162 0.006121 **
UV        1  8.294   8.294  1.3497 0.267916
Licht:UV   1  1.602   1.602  0.2607 0.618922
Residuals 12 73.737   6.145

Response: Trockenmasse
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Licht     1 59.887  59.887 17.4224 0.001290 **
UV        1  7.368   7.368  2.1435 0.168872
Licht:UV   1  8.826   8.826  2.5676 0.135054
Residuals 12 41.248   3.437
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*' 0.1 '.' 1

```

Abbildung 17: R-Output nach der ANOVA der Carotinoid- und Chlorophyllkonzentrationen sowie der Trockenmasse in den Kolben nach 12 Tagen.

Wie aus der Messung der Lichtintensität in den Kolben mit vormontierten Metallblechen zu erkennen ist (siehe Abb.11), ergab sich ein logarithmischer Lichtgradient. Es wurden die Messwerte der Kolben 2, 3 und 4 sowie der Kolben 5

und 6 zusammengefasst. Daraufhin entstand ein linearer Gradient, der sich in 5 Lichtgruppen mit Photonenstromdichten von 64, 56, 43, 34 und  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufteilte (siehe Abb. 18). Da scheinbar die Verwendung von Quarzküvetten keinen Einfluss auf die Messergebnisse hatte, ist dass Zusammenlegen legitim. Alle weiteren vergleichenden Ergebnisdarstellungen erfolgen mit den gepoolten Lichtgruppen.

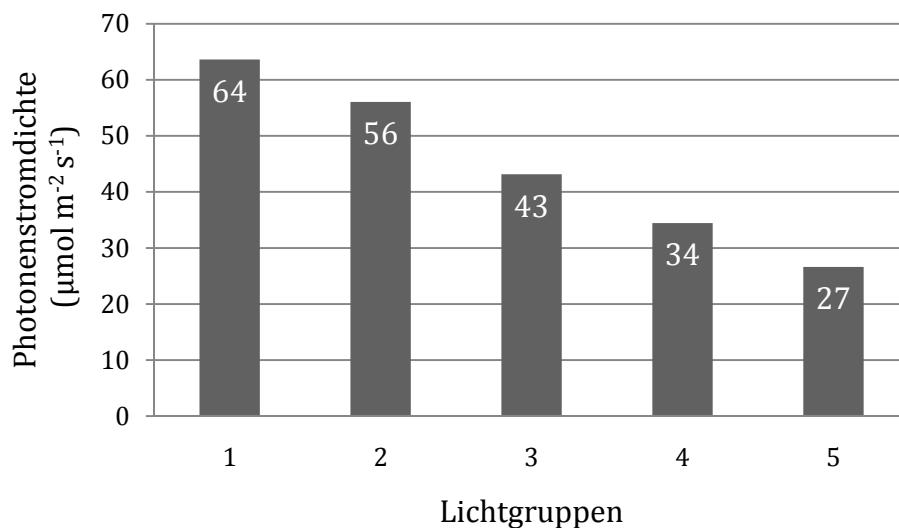


Abbildung 18: Gepoolte Lichtgruppen, wobei Gruppe 1 aus Kolben 2, 3 und 4 und Gruppe 2 aus den Kolben 5 und 6 besteht.

Aus der täglich gemessenen optischen Dichte wurde mit Hilfe des oben beschriebenen linearen Modells die Trockenmasse errechnet. Die aus diesen Daten ermittelten Wachstumskurven sind in Abbildung 19 dargestellt.

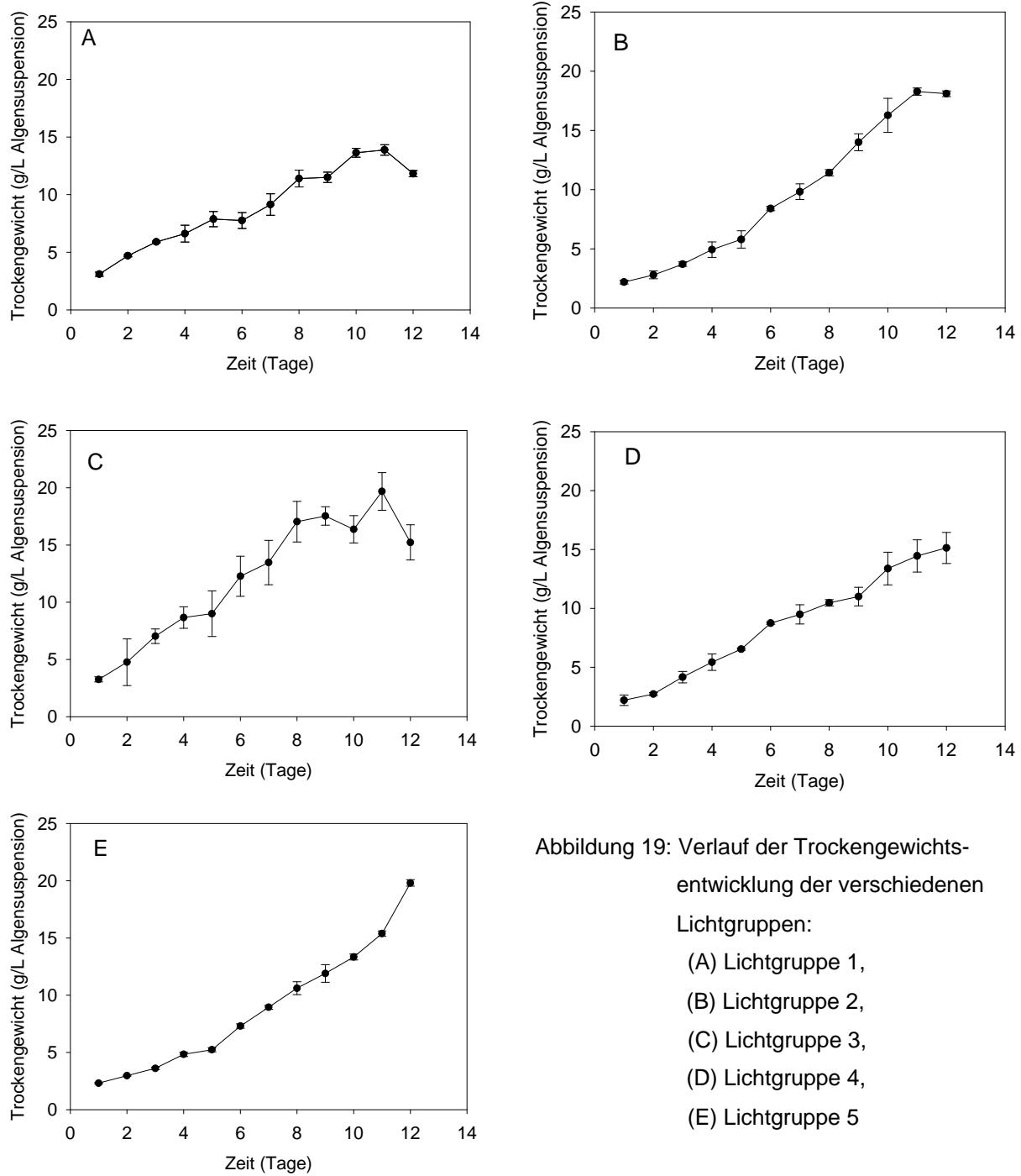


Abbildung 19: Verlauf der Trockengewichtsentwicklung der verschiedenen Lichtgruppen:  
 (A) Lichtgruppe 1,  
 (B) Lichtgruppe 2,  
 (C) Lichtgruppe 3,  
 (D) Lichtgruppe 4,  
 (E) Lichtgruppe 5

Die Trockenmasse der Lichtgruppe 1 stieg zunächst bis zum 11. Tag an, an dem die höchste Trockenmasse von  $13,9 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde. Anschließend verringerte sich der Wert wieder. Bei der zweiten Lichtgruppe nahm die Trockenmasse bis zum 11 Tag linear zu und erreichte dort ihr Maximum bei  $18,3 \text{ g L}^{-1}$ , auf dem es sich auch an Tag 12 befand. Bei der Lichtgruppe 3 ergibt sich an allen Messtagen eine hohe Standardabweichung, was auf die geringe Fallzahl von 2 zurückzuführen ist, da eine Kontamination des Kolbens während des zweiten Versuchsansatzes auftrat. Das Trockengewicht stieg auch hier bis zum 11. Tag auf einen Wert von  $19,7 \text{ g L}^{-1}$  an, wonach es am 12. Tag wieder absank. Bei der 4. Lichtgruppe ist ein kontinuierlicher linearer Anstieg der Trockenmasse zu verzeichnen, wobei noch kein Abbruch der linearen Wachstumsphase zu beobachten war. Die Gruppe mit der geringsten Lichteinstrahlung zeigte einen exponentiellen Anstieg der Trockenmasse, der auch bei Versuchsende nicht abflachte. Mit einem Trockengewicht von  $19,8 \text{ g L}^{-1}$  am 12. Tag ist hier die höchste Gewichtszunahme von allen Lichtstufen zu registrieren.

### 4.3 Pigmentgehalte

Die Ergebnisse aus den täglichen Chlorophyll- und Carotinoidmessungen sind in Abbildung 20 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei der Lichtgruppe 1 sowohl die Chlorophyll-, als auch die Carotinoidkonzentration zunächst linear anstieg, am 10. Tag ihr Maximum erreichte und anschließend wieder absank.

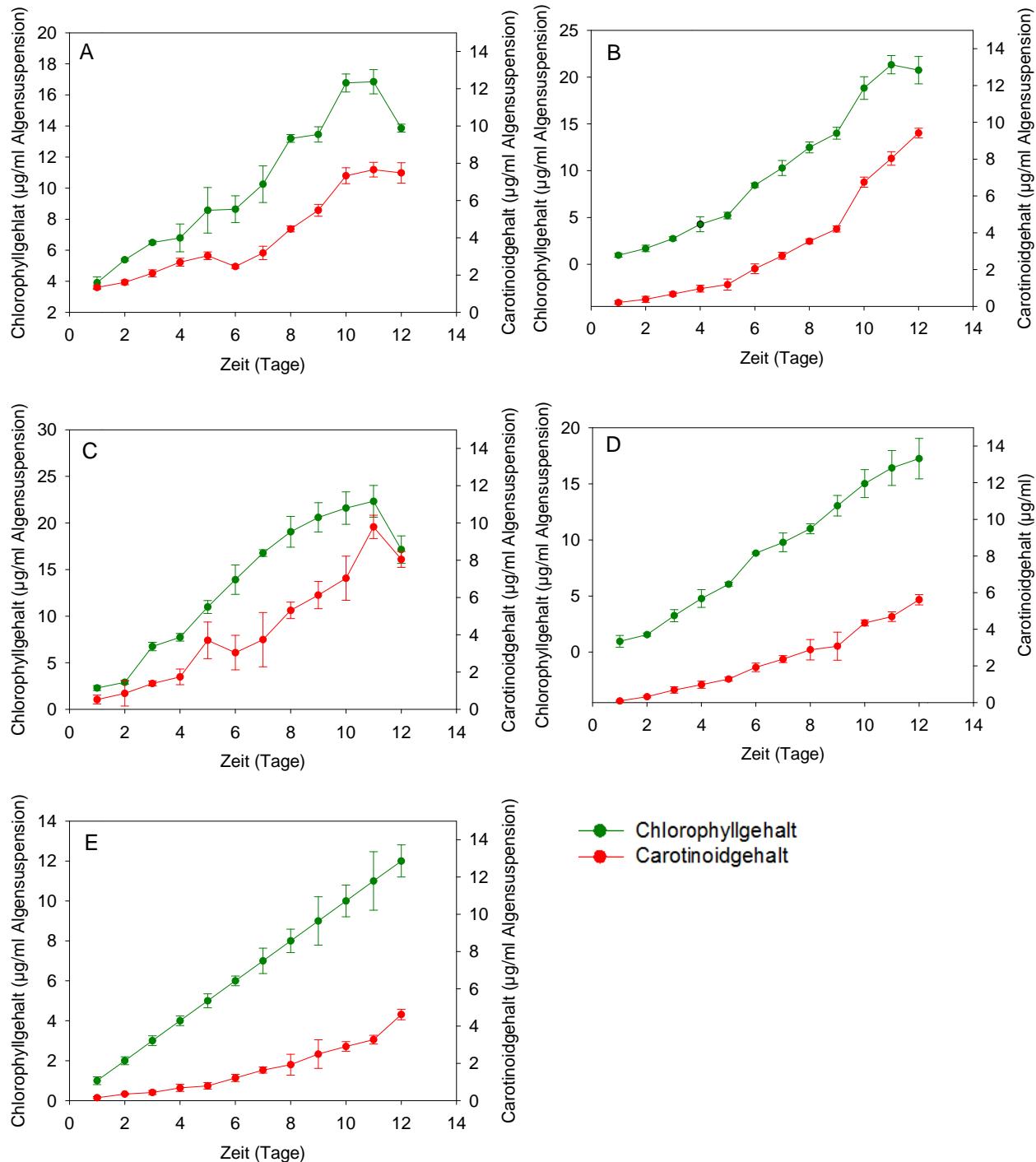


Abbildung 20: Chlorophyll- und Caotinoid-konzentrationen der einzelnen Lichtgruppen:

- (A) Lichtgruppe 1, (B) Lichtgruppe 2, (C) Lichtgruppe 3, (D) Lichtgruppe 4,
- (E) Lichtgruppe 5

Mittels der errechneten Chlorophyll- und Carotinoidkonzentrationen in den Algensuspensionen wurde das Verhältnis der beiden Pigmente zueinander ermittelt. Daraus ließ sich leicht ableiten, ob die *H. pluvialis* Zellen als vegetativ wachsende Zellen oder als Aplanosporen vorlagen. Bei einem hohen Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnis handelte es sich um die vegetative Form von *H. pluvialis* Zellen. Bei einem niedrigen Verhältnis lagen Aplanosporen vor.

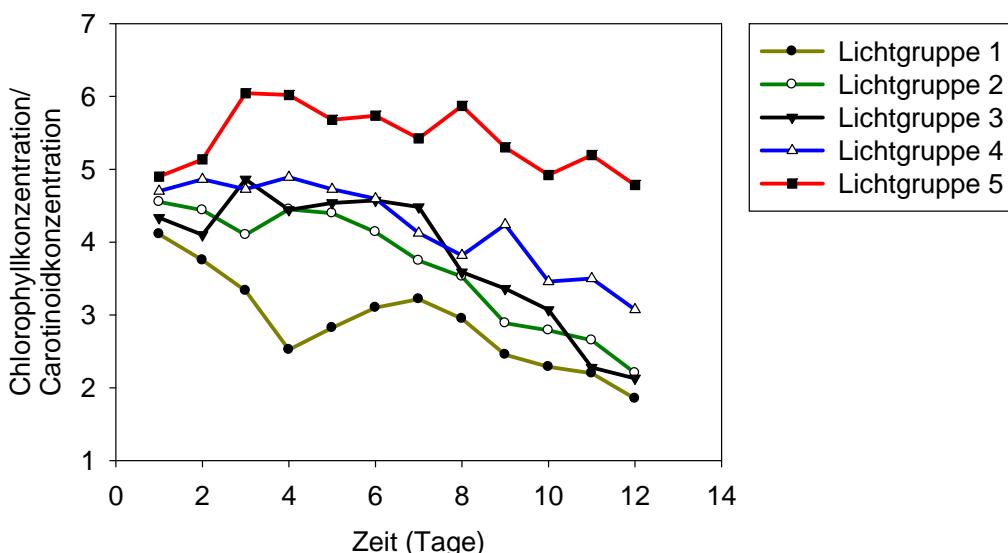


Abbildung 21. Entwicklung des Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnisses während des Kulturverlaufs

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass das Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnis bei den Lichtgruppen 1-4 bei zunehmender Versuchsdauer sank, wohingegen es sich bei Lichtgruppe 5 auf einem Niveau hielt. Der Chlorophyllgehalt betrug zunächst das 4-5fache des Carotinoidgehaltes. Bei den Algen, die den höchsten Lichtintensitäten ausgesetzt waren, fiel das Konzentrationsverhältnis kontinuierlich vom Zeitpunkt des Versuchsbeginns an ab. Das Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnis der Lichtgruppen 2-3 blieb in den ersten Anzuchttagen zunächst auf einem annähernd konstanten Wert und sank dann mit fortschreitender Messdauer kontinuierlich ab.

Die verwendete Methode zur HPLC-Analyse hat sich als geeignet zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Pigmente von *H. pluvialis* erwiesen. Die Peaks in den Chromatogrammen konnten teilweise mit Hilfe von Standards identifiziert werden (siehe Abb. 20). So konnte Astaxanthin nach einer Laufzeit von 5,25 Minuten nachgewiesen werden. Es besaß ein charakteristisches Absorptionsmaxima bei 477 nm.  $\beta$ -Carotin verfügte über zwei spezifische Absorptionsmaxima bei 451 nm und

477 nm. Es konnte nach einer Retentionszeit von 18,88 Minuten ermittelt werden (siehe Abb. 22).

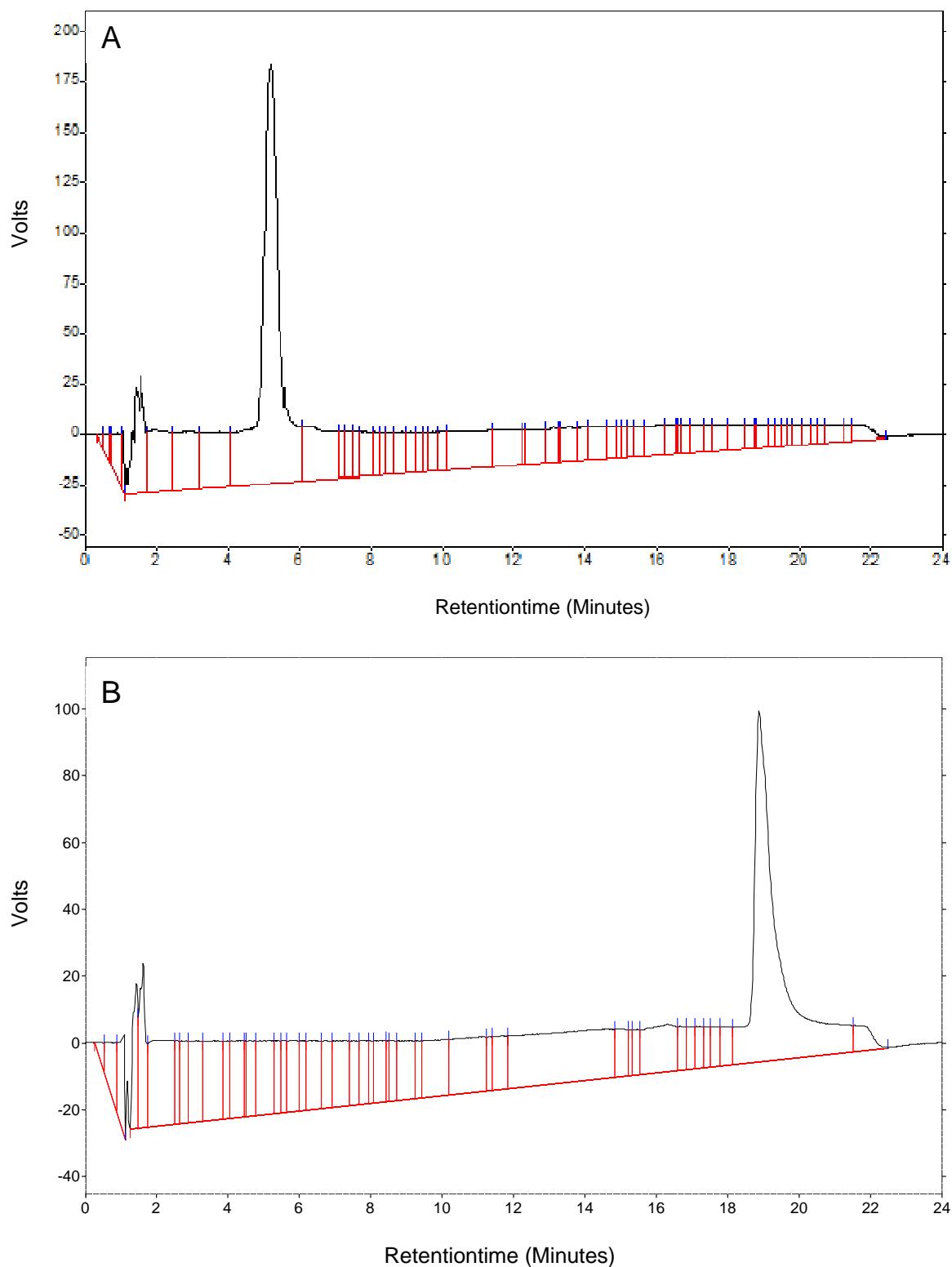


Abbildung 22. HPLC Analysen des (A) Astaxanthinstandards ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) und des (B)  $\beta$ -Carotinstandards ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ )

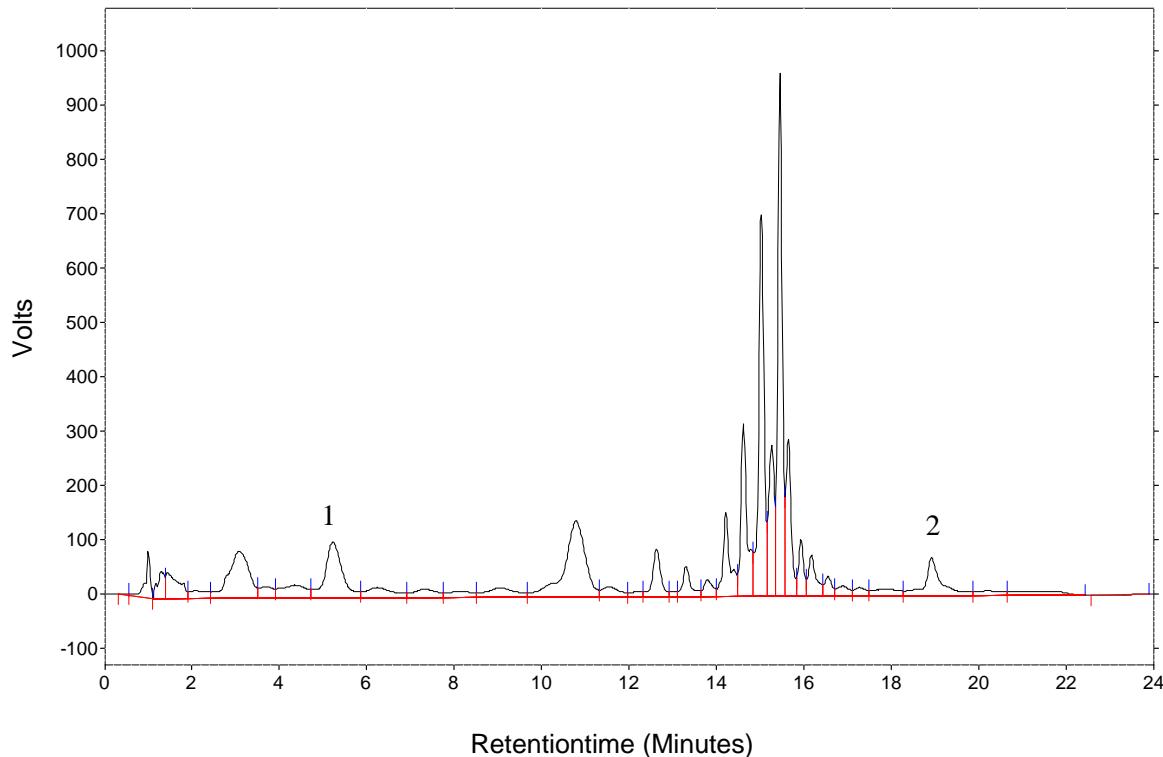


Abbildung 23: HPLC-Analyse einer Algenprobe. (1) – Astaxanthin, (2) –  $\beta$ -Carotin

Um aus den aus der HPLC Analyse gewonnenen Daten auch quantitative Rückschlüsse ziehen zu können, wurde zunächst aus der erstellten Astaxanthineichreihe eine Geradengleichung ermittelt (siehe Abb. 24).

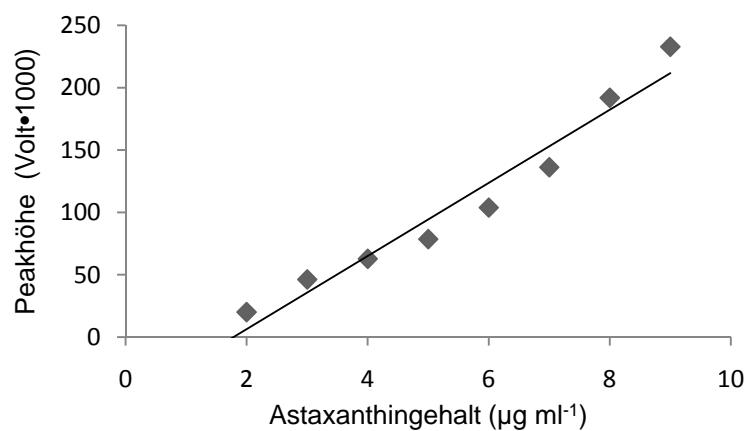


Abbildung 24: Eichgerade zur Bestimmung des Astaxanthingehaltes der HPLC Analysen

Um die Genauigkeit der Messmethode zu bestimmen wurden von einigen Proben Doppelansätze untersucht und in weitere Proben bestimmte Mengen Astaxanthin beigemischt, um die Wiederfindungsrate zu ermitteln (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Astaxanthinkonzentrationen zur Ermittlung der Wiederfindungsrate

Probengehalt	Probengehalt + 10 µg Astaxanthindstandard	Wiederfindungsrate des Astaxanthinstandards (%)
10,86	24,53	136,75
10,56	20,16	95,97
7,17	20,64	134,77
9,48	19,15	96,74
7,59	17,10	95,11

Die Wiederfindungsrate des Astaxanthinstandards lag im Mittel bei 112%, also etwas höher als der Werte der ursprünglich eingesetzten Menge.

Die aus der Geradengleichung ermittelten Astaxanthinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden für die Lichtgruppen zusammengefasst und in einem Balkendiagramm mit den Gesamtcarotinoidgehalten verglichen (siehe Abb. 25).

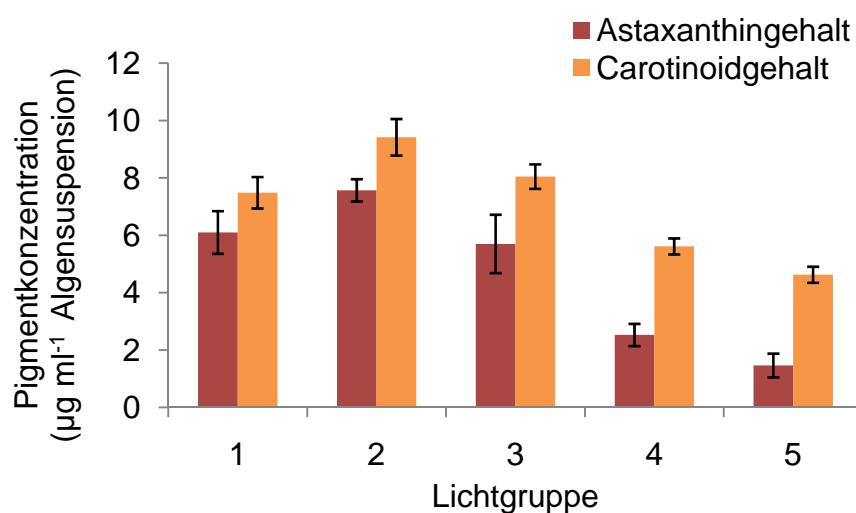


Abbildung 25: Carotinoid- und Astaxanthingehalt der Lichtgruppen nach 12 Tagen Anzucht

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, macht der Astaxanthingehalt einen großen Anteil des Gesamtcarotinoidgehaltes aus. Bei der Lichtgruppe 2 ist der Astaxanthingehalt mit 7,6 µg/ml am höchsten. Bei geringen Lichtintensitäten sinkt der

Astaxanthingehalt ab. Um zu ermitteln, ab welcher Lichtstufe ein signifikanter Unterschied im Astaxanthingehalt vorliegt, wurde eine MCP (multiple comparison procedure)-Analyse der Daten durchgeführt. Dabei wurden die jeweils aufeinanderfolgenden Gruppen miteinander verglichen (siehe Abb. 26).

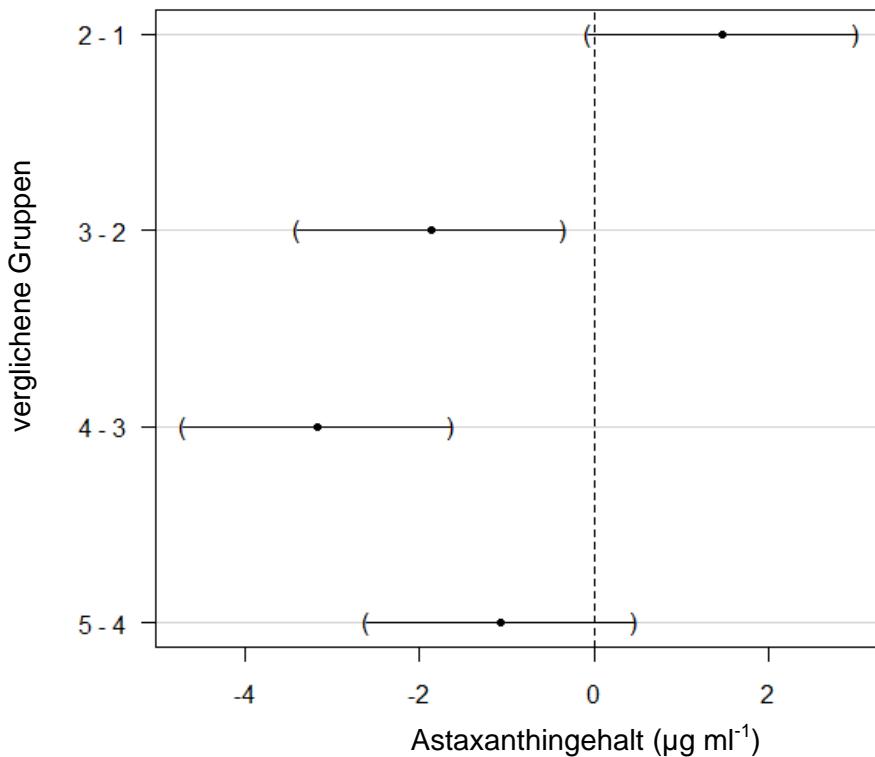


Abbildung 26: 95%ige zweiseitige Konfidenzintervalle des Astaxanthingehaltes aufeinanderfolgender Lichtgruppen

Anhand der 95%igen zweiseitigen Konfidenzintervalle in Abbildung 23 ist zu ersehen, dass sich der Astaxanthingehalt zwischen den Lichtgruppen 1 und 2 nicht signifikant unterscheidet. Der Astaxanthingehalt der Lichtgruppe 3 ist im Mittel um  $1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$  geringer, als jener der Lichtgruppe 2. Ebenso verhält es sich beim Vergleich der Lichtgruppe 3 mit der 4. Lichtgruppe. Diese unterscheiden sich im Mittel um  $3,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Zwischen den Lichtgruppen 4 und 5 ist wiederum kein signifikanter Unterschied im Astaxanthingehalt vorhanden.

## 5 Diskussion

Mit dem ZaKi 2.0 konnte erfolgreich ein Anzuchtsystem zur Algenproduktion entwickelt werden. Sowohl eine Temperaturregelung, als auch eine Lichtsteuerung

wurden in dieses System integriert. Die Problematik der sich absetzenden Algen konnte nicht befriedigend gelöst werden, ebenso wie die Kontaminationsgefahr durch die Probenentnahme und das mit einem pH-Wert von 7 sehr anfällige Anzuchtmedium. Hier bedarf es noch der Entwicklung weiterführender Methoden. Es zeigte sich weiterhin, dass eine Anzucht unter gleichen Lichtbedingungen sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich in einem mehrkolbigen Bioreaktor ist. Die Lichtintensität muss somit bei der Ergebnisbetrachtung immer mit berücksichtigt werden.

Die Zellzahlbestimmung mit dem Haematocytometer erwies sich als äußerst ungenau, was unter anderem am hohen Vorhersagefehler und dem hohen Bestimmtheitsmaß des Vorhersagemodells verdeutlicht wird. Dies könnte darin begründet sein, dass sich die Zellen häufig verklumpten und damit ein repräsentatives Auszählen unmöglich wurde.

Aus der Varianzanalyse zeigt sich, dass eine UV-Bestrahlung keinen Einfluss auf das Wachstum und die Pigmentzusammensetzung der untersuchten Proben hat. Da jedoch eine Messung der spektralen Verteilung in den Kolben im UV-Bereich aufgrund eines fehlenden Messgerätes nicht durchgeführt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die real auftretende Lichtintensität im UV-Bereich zu gering für eine Stressinduktion war. Bezuglich dieses Einflussfaktors sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden und eventuell neue Leuchtstoffröhren montiert werden, um eine ausreichende Bestrahlung im UV-Bereich zu gewährleisten. Es ist aus physiologischen Gründen wahrscheinlich, dass die energiereiche UV-Strahlung bei den Algen zu oxidativem Stress führt, worauf diese mit einer erhöhten Syntheserate an Astaxanthin reagieren könnten (Yahong *et al.* 2008).

Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass die Biomasseproduktion bei den Lichtgruppen 1, 2 und 3 jeweils ihre Sättigungsphasen erreichten, was anhand der fallenden Kurvenverläufe zum Ende der Untersuchungsdauer deutlich wird. Die Steigung nimmt von einen linearen Anstieg bei einer Photonstromdichte von  $34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf einen exponentiellen Anstieg bei  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zu. Es zeigt sich somit, dass die Lichtintensität einen invers proportionalen Einfluss auf die Biomasseproduktion hat. Dies könnte auf photoinhibitorische Effekte zu starker Lichtintensitäten zurückzuführen sein, die offenbar bei einer Photonstromdichte von  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  schon einsetzen.

Analog zum Verlauf der Wachstumskurven verhält sich die Entwicklung der Chlorophyllkonzentrationen. Nach einem linearen Konzentrationsanstieg erreicht der

Chlorophyllgehalt bei den Lichtstufen 1, 2 und 3 nach spätestens 12 Tagen sein Maximum, wohingegen er sich bei den Lichtgruppen 4 und 5 noch im linearen Anstieg befindet. Dies ist nicht verwunderlich, da beim photoautotrophen Wachstum der Chlorophyllgehalt mit der Photosytheserate korreliert und die Photosynthese ihrerseits als energieliefernder Prozess in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum und der Teilung der Zellen steht. Eine klare Korrelation zwischen der Lichtintensität und dem Gesamtcarotinidgehalt ist nicht zu erkennen, da bei den Lichtgruppen 1 und 3 der Carotinidgehalt nach 12 Tagen sein Maximum erreicht, er bei den Lichtgruppen 2, 4 und 5 jedoch weiterhin ansteigt. Deutlich wird ein Zusammenhang zwischen dem Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnis und der Lichtintensität erkennbar. Mit zunehmender Lichtintensität und steigender Versuchsdauer sinkt das Verhältnis der beiden Konzentrationsgrößen zueinander schneller ab, da der Carotinidgehalt schneller steigt als der Chlorophyllgehalt. Bei der geringsten Photonenstromdichte von  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bleibt das Verhältnis konstant, da beide Konzentrationen im gleichen Maße zueinander ansteigen.

Es konnte eine Abhängigkeit des Astaxanthingehaltes von der Lichtintensität bewiesen werden. Zunächst ist ein Fallen des Astaxanthingehaltes bei einer Verringerung der Lichtintensität von 56 auf  $43 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zu verzeichnen, der sich dann bei einer Photonenstromdichte von 43 auf  $34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nochmals vermindert. Des Weiteren ist zu beobachten, dass Astaxanthin den größten Anteil der Carotinoide in *H. pluvialis* Zellen ausmacht. Somit konnte die aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Dies lässt die Frage auftreten, welche physiologische Rolle Astaxanthin bei *H. pluvialis* spielt. Yong und Lee (1991) behaupten, dass Astaxanthin eine Abschirmfunktion besitzt. Damit bewirkt es eine Verminderung der Absorption an photosynthetischem Licht, vor allem im blauen Wellenlängenbereich des Chlorophylls a. Eine von Hagen *et. al* (1993) postulierte Hypothese ist, dass das extrachloroplastidäre Astaxanthin als physikochemische Abwehrbarriere fungiert, um photodynamische Schäden durch freie Radikale zu verhindern. Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Akkumulation von Astaxanthin es den *H. pluvialis*-Zellen ermöglicht photooxidative Schäden zu verhindern und ungünstige Wachstumsbedingungen zu bewältigen (Wang *et al.* 2003).

Eine Produktion von Astaxanthin in industriellem Maßstab ist heutzutage noch unwirtschaftlich, was auf die geringe Wachstumsrate von *H. pluvialis* zurückzuführen ist. Hier können molekularbiologische Methoden eine Lösung finden. So inserierten

León et al. mehrere Gene des Astaxanthinmetabolismus aus *H. pluvialis* in die Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*, da die Alge eine bedeutend höhere Wachstumsrate besitzt.

## 6 Literatur

- Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S., Davison A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll *a* and *b* in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany 32: 85-100.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 1995. Carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis, Birkhäuser Verlag, Berlin, 215.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 2004. Carotenoids. Handbook, Birkhäuser Verlag, Berlin, 404.
- Czygan, F.C. 1970. Blutregen und Blutschnee: Stickstoffmangel-Zellen von *Haematococcus pluvialis* und *Chlamydomonas nivalis*. Archives of Microbiology 74: 69-76.
- Del Río, E., Acién, F.G., García-Malea, M.C., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G. 2007. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*, Biotechnology and Bioengineering 100: 397-402.
- Domínguez-Bocanegra A.R., Ponce-Noyola T., Torres-Muñoz J.A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. Applied Microbiology and Biotechnology 75: 783–791.
- Evens T.J., Niedz R.P., Kirkpatrick P.G. 2008. Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). Journal of Applied Phycology 20, 411-422.
- Hagen, C., Braune, W., Greulich, F. 1993. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales), IV. Protection from photodynamic damage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 20: 153–60.
- Hata N., Ogbonna J.C., Hasegawa Y., Taroda H., Tanaka H. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture, Journal of Applied Phycology 13: 395–402.

- Kaewpintong K., Shotipruk A., Powtongsook S., Pavasant P. 2007. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology 98: 288–295.
- Kang, C.D., Lee J.S., Park T.H., Sim S.J. 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. Biotechnological products and process engineering 74: 987-994
- Léon R., Couso I., Fernández E. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoids Biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, Journal of Biotechnology 130: 143–152.
- Lorenz R.T., Cysewski G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of Astaxanthin, Trends in biotechnology 18: 160 -167.
- Nuhn P. 2006. Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 217.
- Olaizola M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. Journal of Applied Phycology 12: 499–506.
- Röbbelen, G. 1957. Eine Blattfarbmutante ohne Chlorophyll b von *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Naturwissenschaften 64 (4): 288-289.
- Steinbrenner J., Linden H. 2003. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. Plant Molecular Biology 52: 343–356.
- Wang B., Zarka A., Trebst A., Boussiba S. 2003. ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* (CHLOROPHYCEAE) AS AN ACTIVE PHOTOPROTECTIVE PROCESS UNDER HIGH IRRADIANCE. Journal of Phycology 39: 1116-1124.
- Yanhong S., Jianguo L., Xiaoli Z., Wie L. 2008. Strain H<sub>2</sub>-419-4 of *Haematococcus pluvialis* induced by ethyl methanesulphonate and ultraviolet radiation. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 26 (2): 152-156
- Yong, Y. Y. R., Lee, Y.-K. 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (*Chlorophyta*)? Phycologia 30: 257–61.

## 7 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. S. Bickel, die für stete Heiterkeit und Fröhlichkeit sorgte, und Prof. Dr. T. Rath, der einem immer mit Rat und Tat zur Seite stand sowie Prof. Dr. B. Huchzermeyer für ein immer offenes Ohr.

Weiterer Dank gebührt den Mitarbeitern der Werkstatt des Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik für die Unterstützung bei der handwerklichen Umsetzung bei der Konstruktion des ZaKi 2.0.

Ebenso möchte ich mich bei H. Feierabend und J. Volker für die Hilfestellungen im Labor bedanken.

Größter Dank gilt Serge Zagermann für die konstruktive und fortdauernd amüsante Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Vater, meiner Mutter und meiner Schwester für ihre stets ermunternden Worte bedanken.

## Eidesstattliche Erklärung zur Bachelorarbeit

Name: Kitsche

Vorname: Andreas

Ich versichere, die Bachelorarbeit selbständig und lediglich unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Hannover, den 03. September 2008

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)