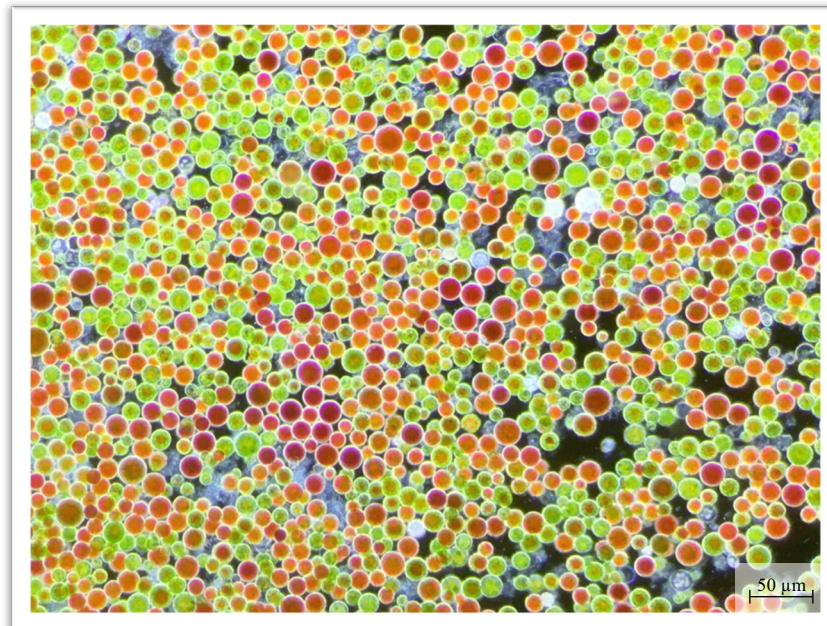


ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN
DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT
INSTITUT FÜR UMWELT UND NATÜRLICHE RESSOURCEN (IUNR)

Wachstum verschiedener *Haematococcus pluvialis* Stämme in unterschiedlichen Nährmedien und Entwicklung einer neuen Analyse zur Bestimmung des Astaxanthin-Gehaltes



Bachelorarbeit

von

Jonas Michael Windisch

Bachelorstudiengang: Umweltingenieurwesen

Abgabedatum: 08.07.2021

Studienrichtung: Erneuerbare Energien und Ökotechnologien

Fachkorrektoren:

Dr. Dominik Refardt und Sophia Egloff

ZHAW Life Sciences und Facility Management, Grüental, 8820 Wädenswil

Titelbild: Eigenes Foto, 20-fache Vergrößerung

Abstract

Die weltweit verbreitete einzellige Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Blutregenalge) bildet unter Stressbedingungen das Carotin Astaxanthin. Kommerziell wird Astaxanthin als Farbstoff in der Fischzucht, in der Kosmetikindustrie und als Nahrungsergänzungstoff verwendet. Für eine möglichst effiziente Produktion ist es wichtig, optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen und den besten Erntezeitpunkt mit dem grösstmöglichen Astaxanthin-Gehalt zu erkennen. Deswegen wurde in dieser Arbeit die Eignung vom Nährmedium OHM (optimales *Haematococcus* Medium) für die Kultivierung verschiedener *H. pluvialis* Stämme untersucht. Ausserdem wurde mittels einer Bildanalyse der Astaxanthin-Gehalt geschätzt und mit einer UV/VIS-Analyse verglichen werden. Dazu wurden vier *H. pluvialis*-Stämme (SAG 192.80, SAG 34-1B, CCAP 34/6, CCALA 793) während 31 Tagen in den Nährmedien OHM und in 3N-BBM+V kultiviert. Dabei konnte bestätigt werden, dass für die Kultivierung von *H. pluvialis* das Nährmedium OHM besser geeignet ist (dreimal besseres Wachstum) als 3N-BBM+V. Ausserdem zeigte sich, dass die Wahl des Stammes keinen Einfluss auf die maximale Zellzahl, die Wachstumsrate und die Verdoppelungszeit hat. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich der pH im OHM konstanter als im 3N-BBM+V verhält. Bei den replizierten Kulturen des Stammes CCALA 793, die im OHM-Medium kultiviert wurden, wurde die Stressphase mittels nährstoffarmen Mediums (ADaM) eingeleitet. Die Grössenverteilung der Zellen in der Kultur veränderte sich im Verlauf der Stressphase. Es kam zu einer Verschiebung der Zell-Durchmesser von kleinen Zellen zu grossen Zellen. Mit dem Programm Fiji konnte der Astaxanthin-Gehalt in Flächenprozent geschätzt werden. Anhand des Vergleichs mit der UV/VIS-Standardkurve konnte der genaue Astaxanthin-Gehalt in mg/g ermittelt werden. Der Rot-Anteil in Flächenprozent war ein guter Vorhersager für den Astaxanthin-Gehalt von *H. pluvialis*-Zellen. Der lineare Zusammenhang konnte mit der folgenden Gleichung beschrieben werden: Astaxanthin-Gehalt [mg/g] = 5.9854 + 19.2006 · Rot-Anteil [Flächen-%].

The worldwide common single-celled green alga *Haematococcus pluvialis* produces the carotene astaxanthin under stressful conditions. Commercially, astaxanthin is used as a dye in fish farming, in the cosmetics industry and as a dietary supplement. For an efficient production, it is important to achieve optimal growth conditions and to record the best harvest time with the highest possible astaxanthin content. Therefore, the suitability of the nutrient medium OHM (optimal *Haematococcus* medium) for the cultivation of various *H. pluvialis* strains was investigated. In addition, the astaxanthin content was to be estimated by an image analysis and compared with an HPLC analysis. For this purpose, four *H. pluvialis* strains (SAG 192.80, SAG 34-1B, CCAP 34/6, CCALA 793) were cultivated for 31 days in the nutrient mediums OHM and in 3N-BBM+V. In summary, the culture medium OHM was more suitable (three times better growth) for the cultivation of *H. pluvialis* than 3N-BBM+V. It is also shown that the choice of the strain had no significant influence on the maximum cell count, the growth rate and the doubling time. Furthermore, the pH behaved more consistently in the OHM than in the 3N-BBM+V. In the replicated cultures of the CCALA 793 strain, which are cultivated in the OHM medium, the stress phase was initiated by a nutrient-poor medium (ADaM). The size distribution of cells in the culture changed during the stress phase. There was a shift of the cell diameters from small cells to large cells. With the open source image processing program Fiji, the astaxanthin content could be estimated as a percentage by area. Based on the comparison with the UV/VIS standard curve, the exact astaxanthin content in mg/g could be determined. The red content given as area percent was a good predictor for the astaxanthin content of *H. pluvialis* cells. The linear relationship could be described with the following equation: astaxanthin content [mg/g] = 5.9854 + 19.2006 · red content [area-%].

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin, OHM, Bildanalyse, ImageJ Fiji

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Inhaltsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. <i>Wachstumsphase</i>	3
2.2. <i>Stressphase</i>	4
2.3. <i>Datenerfassung und Auswertung</i>	4
3. Resultate	6
3.1. <i>Zelldichte und pH</i>	6
3.2. <i>Größenverteilung</i>	8
3.3. <i>Rot-Verfärbung</i>	9
3.4. <i>Astaxanthin-Gehalt</i>	10
3.5. <i>Absorptionsspektrum</i>	11
4. Diskussion	12
5. Literaturverzeichnis	15
6. Abbildungsverzeichnis	18
7. Tabellenverzeichnis	18
8. Anhang	19
8.1. <i>Fiji-Script</i>	19
8.2. <i>Rohdaten</i>	20
8.3. <i>R-Script</i>	20
8.4. <i>Poster</i>	21

Einleitung

Die weltweit verbreitete einzellige Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Blutregenalge) ist an extreme Lebensräume angepasst. Sie kommt hauptsächlich in kleinen Süßwassertümpeln, Pfützen und auch in temporären Süßwasseransammlungen wie Vogeltränken vor (Burchardt et al., 2006; Han et al., 2013). Diese Gewässer unterliegen täglichen Schwankungen der Salzkonzentration oder der Lichtintensität, die durch starke Verdunstung, Regenfälle und durch Beschattung hervorgerufen werden (Burchardt et al., 2006). Unter verschiedenen Stressbedingungen, wie stickstofflimitierende Bedingungen, bei Phosphat- oder Schwefelmangel, bei erhöhter Temperatur, bei hoher Lichtintensität und Salzstress kommt es zum Übergang in ein Dauerstadium (Aplanospore) und zu einer Anreicherung von Astaxanthin (Hagen et al., 2002). Die Astaxanthin-Produktion dient damit als Schutzmechanismus in lebensfeindlicher Umgebung. Als Aplanospore kann *H. pluvialis* bis zu 5 Jahre solchen Stressbedingungen trotzen und überleben (Jannel et al., 2020).

Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -carotin-4,4'-dion) ist ein kommerziell interessanter Farbstoff. In der Industrie wird Astaxanthin hauptsächlich in der Aquakultur verwendet. So werden die eigentlich weissfleischigen Regenbogenforellen mit Astaxanthin gefüttert, um das nun lachsrot gefärbte Fleisch als Lachsforelle zu vermarkten (Choubert et al., 2006). Neben dem Einsatz von Astaxanthin als Farbstoff in der Fischzucht wird Astaxanthin immer wichtiger in der Kosmetikindustrie oder als Nahrungsergänzungstoff mit gesundheitsfördernden Eigenschaften für den Menschen (Guerin et al., 2003).

Es sind viele Nährmedien gebräuchlich (BG-11, BBM, KM1-Basal-Medium, OHM), die sich aber unterscheiden bezüglich Zelldichte (Shah et al., 2016). Das Optimale *Haematococcus* Medium (OHM) zeigt für den Stamm CCAP 34/6 eine bis zu dreimal höhere Zelldichte als mit herkömmlichen Nährmedien (Fábregas et al., 2000). Die zusätzlichen Mikronährstoffe wie Selen und Chrom führen dabei zu einer erhöhten Biomasse- und Astaxanthin-Produktion (Tripathi et al., 1999). Für ein optimales Wachstum während der Anzuchtphase muss der pH konstant bei 7.5 liegen, denn ein zu tiefer bzw. zu hoher pH hemmt das Wachstum (Hata et al., 2001; Sarada et al., 2002). Ausserdem müssen mindestens 1.5 % (v/v) CO₂ ins Nährmedium geleitet werden, denn zu wenig CO₂ bremst das Wachstum und zu viel CO₂ senkt den pH (Zhang et al., 2014). Ebenso muss die Temperatur zwischen 18 bis 20 °C liegen, da eine zu tiefe Temperatur das Wachstum bremst und höhere Temperaturen zur Astaxanthin-Bildung führen (Trommler, 2005). Nach dem Erreichen der stationären Phase kann für die Astaxanthin-Produktion die Stressphase eingeleitet werden. Dafür muss das Stressmedium nährstoffarm sein oder die Temperatur kann auf 25 bis 30 °C erhöht werden (Tjahjono et al., 1994). Bei einem NaCl-Salzgehalt von 0.25 – 0.5 % und bei der Zugabe von Natriumacetat (2,2 mM) kann die Astaxanthin-Produktion weiter gesteigert werden (Sarada et al., 2002). Eine allmähliche Erhöhung der Lichtintensität kann zu einer besseren Akkumulation von Astaxanthin beitragen (Park et al., 2014). Nach 14-16 Tagen ist der Astaxanthin-Gehalt am grössten und kann bei einer erfolgreichen Kultivierung 2 bis 4 % der Algentrockenmasse erreichen (Kim et al., 2020; Trommler, 2005).

Für eine möglichst effiziente Produktion ist es wichtig, den Erntezeitpunkt mit dem grösstmöglichen Astaxanthin-Gehalt zu erfassen. Dazu wird meistens der Astaxanthin-Gehalt mittels einer Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder mittels UV/VIS Spektrometer analysiert. Charakteristisch für Astaxanthin ist ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 475-485 nm (Lu et al., 2010). Jedoch sind HPLC und UV/VIS Spektrometer sehr teuer in der Anschaffung (ca. 15'000 CHF) und wartungsintensiv (Arndt, 2019). Die Aufbereitung der Proben und die Analyse sind zeitintensiv. Deshalb wäre es aus zeitlichen und ökonomischen Gründen interessant, eine Alternative zu bestehenden Analyseverfahren des Astaxanthin-Gehaltes zu entwickeln. Es wurden bereits Methoden entwickelt um Astaxanthin-Gehalt mittels Durchflusszytometrie oder Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) einfacher und schneller zu analysieren (Chen et al., 2017; Liu et al., 2015). Jedoch benötigen auch diese Analysetechniken teure Laborgeräte. In der Medizin und in der Biologie wird für das Vermessen von Strukturen und das Untersuchen von Pigmenten auf Mikroskop-Aufnahmen häufig eine spezielle Bildanalyse-Software genutzt (Kröner & Carbó, 2013). So können mit der Open-Source Software Fiji von ImageJ einzelne Zellen auf Mikroskop-Aufnahmen einfach erkannt und deren farbige Pigmente quantifiziert werden (Schulze et al., 2011).

In dieser Arbeit soll mithilfe der Bestimmung der Zelldichte, Beurteilung der Wachstumskurve und Einfluss des pH-Wertes die Eignung von OHM für die Kultivierung verschiedener *H. pluvialis* Stämme bestätigt werden. Ausserdem soll geprüft werden, ob mit der Erfassung des Parameters Rot-Färbung (Flächen- und Volumen-Prozent) mittels Bildanalyse der Astaxanthin-Gehalt geschätzt werden kann. Dafür soll die genaue Astaxanthin-Konzentration mit einer UV/VIS Spektrometer bestimmt werden und eine Standardkurve zum Vergleich der Bildanalyse erstellt werden.

Material und Methoden

1.1. Wachstumsphase

Die vier *H. pluvialis*-Stämme SAG 192.80 (Herkunftsland Deutschland), SAG 34-1B (Tschechien), CCAP 34/6 (Finnland), CCALA 793 (Tschechien) wurden bei 19 °C, 115 rpm, einer kontinuierlichen Beleuchtung mit einer Photonenflussdichte von 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer CO_2 -Atmosphäre von 1.5 % (v/v), im Inkubator (Multitron Pro Infors HT) kultiviert. Es wurden die Nährmedien OHM und 3N-BBM+V für einen Zuwachs von 3 g/L verwendet (Tabelle 1). Der Zuwachs wurde nach Doucha & Lívanský anhand des Stickstoffs und Phosphor hochgerechnet (Doucha & Lívanský, 2006). Das Verhältnis von N:P im OHM war 8.67:1 und im 3N-BBM+V 4.19:1. Der pH wurde mittels Zugabe von 1M NaOH auf 7.5 eingestellt. Die 48 100 ml-Erlenmeyerkolben (2 Medien, 4 Stämme, 6 Replikate) mit je 60 ml Nährmedium und einer Startkonzentration von ca. 10'000 Zellen pro ml wurden während 31 Tagen inkubiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für die Kultivierung von *H. pluvialis*, angepasst für einen Zuwachs von 3 g/L

Inhaltsstoffe [mg/L]	OHM	3N-BBM+V
KNO_3	2'050	
NaNO_3		1'644
Na_2HPO_4	150	
K_2HPO_4		181
KH_2PO_4		143
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	554.5	87
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.06	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1'232.5	225
NaCl		75
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	13.1	11.75
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4.945	0.738
ZnCl_2		0.09
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.055	0.036
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.6	0.072
Cr_2O_3	0.38	
SeO_2	0.025	
Vitamin B12	0.075	0.1
Biotin	0.125	0.4
Thiamin HCl	0.0875	2

1.2. Stressphase

Nach den 31 Tagen wurde bei den replizierten Kulturen des Stammes CCALA 793, die im OHM Medium kultiviert wurden, eine Stressphase eingeleitet. Dazu wurde die Algenmasse zentrifugiert (3'000 g, 20 °C, 3 min) und das Pellet dreimal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Algen in drei Erlenmeyerkolben mit je 100 ml ADaM-Medium (0.333 g/L Meersalz, 1.84 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.66 mM NaHCO₃, 0.0013 mM SeO₂; nach Klüttgen et al., 1994) gegeben und für 14 Tage inkubiert.

1.3. Datenerfassung und Auswertung

Während der Wachstumsphase wurden zweimal wöchentlich die Zelldichte (Zellen/ml) und der pH bestimmt. Die Zelldichte wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kammer-Tiefe = 0,2 mm, Kammer-Volumen = 3,2 µl, Anzahl Kleinquadrate = 256, Fläche eines Kleinquadrates = 0,0625 mm²) ermittelt. Mit der Formel $Z_U = (Z_a \cdot V_f \cdot 1000) / (K_A \cdot K_F \cdot K_T)$, wobei Z_U = Zellen pro ml Untersuchungsmaterial, Z_a = ausgezählte Zellen, V_f = Verdünnungsfaktor des Untersuchungsmaterials, K_A = Ausgezählte Kleinquadrate, K_F = Fläche eines Kleinquadrates und K_T = Kammertiefe sind, konnte die Zelldichte pro ml Medium bestimmt werden. Für die pH-Messung wurde 1 ml der Kultur in ein 1.5 ml Proberöhrchen transferiert und gemessen (Hach, INTELLICAL PHC108). Die Rohdaten befinden sich im Anhang 8.2.

Während der Stressphase wurde mit dem Mikroskop zweimal wöchentlich ein Bild pro Replikat aufgenommen (Mikroskop: Leica DM5500 B, Kamera: Leica MC170 HD). Dabei wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Objektiv = 20x, Intensität = 75, Aperturblende = 10, Feldblende = 33, Helligkeit = 40, Sättigung = 100, Gamma = 0.6. Mit dem Open Source Bildverarbeitungstool Fiji (Version 2.1.0/1.53c, basierend auf ImageJ) wurden die Bilder analysiert. Dazu wurde die Fläche aller Zellen mit einem Durchmesser von 8-50 µm ausgewählt und dann die roten Zellbereiche selektiert (Abbildung 1). Das Fiji-Skript befindet sich im Anhang 8.1. Die gemessenen Flächen (in Pixel) wurden in µm umgerechnet (Bildgröße 2592 x 1944 Pixel, wahre Größe 553.75 x 415.31 µm). Da die Position der gemessenen Flächen bekannt war, konnten die roten Zellbereiche (x/y) den jeweiligen Zellen (m_1/m_2 , mit Radius r) zugeordnet werden. Denn wenn $(x-m_1)^2 + (y-m_2)^2 \leq r^2$ ist, liegt der rote Zellbereich innerhalb der Zelle. Anhand der nun bekannten Zellfläche und den dazugehörigen roten Zellbereiche, konnte der Durchmesser der Zellen (in µm) und Rot-Anteil der einzelnen Zellen (in Flächenprozent und Volumenprozent) bestimmt werden. Die Rohdaten befinden sich im Anhang 8.2.

Ausserdem wurde während der Stressphase zweimal wöchentlich 1 Gramm Algenmasse entnommen für die UV/VIS Analyse. Die Analyse wurde von Michael Edelman der Fachgruppe Funktionsmaterialien und Nanotechnologie durchgeführt. Bei 200 mbar und 40 °C wurden die insgesamt 5 Proben für eine Stunde getrocknet. Anschliessend wurden zweimal 200 mg der Proben und 2 g Natriumchlorid in einen Mahlbecher eingewogen. Die Mahlbecher wurden für 2 Minuten in Flüssigstickstoff getaucht und anschliessend für 1 Minuten in der Kugelmühle gemahlen. Die gemahlene Proben wurden nochmals bei 200 mbar und 40 °C für eine Stunde getrocknet. Danach wurden sie in 50 ml Bechergläser transferiert und 25 ml Aceton dazugegeben. Die Proben wurden über Nacht unter ständigem Rühren im Dunkeln gelassen. Danach

wurden die Suspensionen in 50 ml Falcon Tubes überführt und anschliessend bei 4'000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die flüssigen Phasen wurden mit einer Pasteurpipette in einen 50 ml Messkolben transferiert und mit Aceton aufgefüllt. Aus einer Astaxanthin-Stammlösung (Sigma Aldrich SML0982-50MG) mit der Konzentration 104 mg/L wurde eine Kalibrationsreihe hergestellt mit der nun die Astaxanthin-Konzentration der Algenproben bestimmt werden konnte. Die Spektren der Kalibrationsreihe und der fünf aufbereiteten Algenproben wurden mit einem UV/VIS Spektrometer (Perkin Elmer Lambda 950) von 350 bis 600 nm aufgenommen. Die Rohdaten befinden sich im Anhang 8.2.

Die Diagramme und die Statistik wurden mit der Software R-Studio (Version 1.1.463) durchgeführt (Anhang 8.3). Es wurden für die Wachstumsraten pro Tag, für die maximalen Zellzahlen pro ml Kultur und für den pH alle Kombinationen der Stämme und der Nährmedien gegeneinander getestet, ebenfalls wurde auf Interaktionen geprüft. Im Falle einer Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden die Daten anhand einer two-way ANOVA und einem nachfolgenden Tukey's Post Hoc Test geprüft. Das Signifikanzniveau liegt bei 0.001. Als Mass für die Effektstärke wurde das Eta-Quadrat (η^2 , Wert zwischen 0 und 1) und die Effektstärke f nach Cohen (1992) ($f = 0.10$ entspricht einem schwachen Effekt, $f = 0.25$ entspricht einem mittleren Effekt, $f = 0.40$ entspricht einem starken Effekt) berechnet.

a)

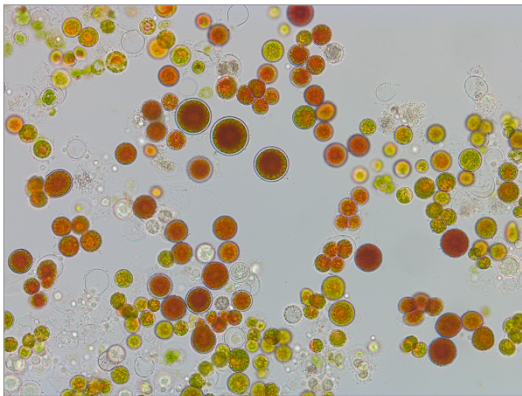


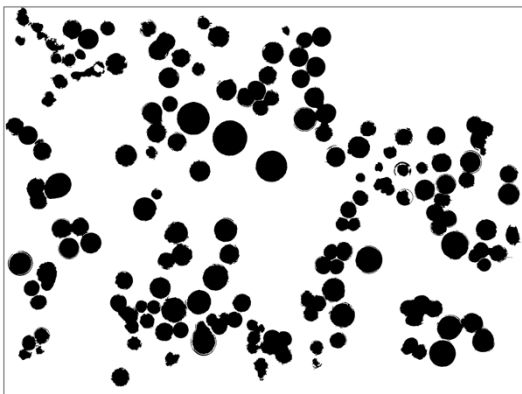
Abbildung 1: Beispiel der Bildanalyse:

a) mit dem Mikroskop aufgenommenes Bild

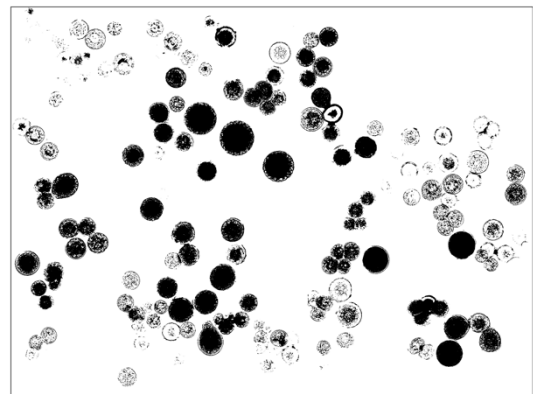
b) Auswahl der ganzen Zellen mit Fiji

c) Auswahl der roten Zellbereiche mit Fiji

b)



c)



Resultate

1.4. Zelldichte und pH

Bei allen kultivierten Stämmen von *H. pluvialis* konnte im OHM ein dreimal besseres Wachstum festgestellt werden als im 3N-BBM+V (Abbildung 2). Dies zeigte sich sowohl in den Raten des exponentiellen Wachstums zu Beginn der Kultivierung ($F_{1,40} = 53.773$, $p < 0.001$) als auch in den maximalen Zellzahlen pro ml Kultur ($F_{1,40} = 3'101.941$, $p < 0.001$). Im 3N-BBM+V liegen die Zelldichte zwischen 1.2 und 1.4 Mio. Zellen pro ml Kultur und im OHM zwischen 3.6 und 3.9 Mio. Zellen pro ml Kultur. Detaillierte Werte zu den einzelnen Nährmedien und Stämme finden sich in der Tabelle 2. Die verwendeten Stämme zeigten leichte Unterschiede, wenn sie nach finalen Biomassen in den beiden Medien geordnet wurden ($F_{3,40} = 6.828$, $p < 0.001$). Verglichen mit dem Unterschied der zwei Nährmedien ($\eta^2 = 99.78\%$, $f = 1.8$) ist der Effekt der Stämme ($\eta^2 = 0.21\%$, $f = 0.047$) allerdings klein.

Der pH sank im OHM nach 31 Tagen Inkubationszeit leicht, im 3N-BBM+V jedoch nahm er zu (Tabelle 3). Der pH lag zu Beginn im OHM zwischen 7.5 und 7.6 und im 3N-BBM+V bei 7.3. In der ersten zwei Wochen schwankte der pH im 3N-BBM+V während der Wachstumsphase zwischen 7.2 und 9.5 (Abbildung 2). Nach 31 Tagen Inkubationszeit sank der pH im OHM auf 7.0 bis 7.1 ab und im 3N-BBM+V stieg der pH auf 7.5 bis 7.9 ($F_{1,40} = 124.18$, $p < 0.001$). Die Kultivierung von SAG 34-1B führte in beiden Medien zu einer vergleichsweise stärkerem Anstieg des pH als bei den anderen drei Stämmen in den entsprechenden Medien ($F_{3,44} = 4.863$, $p < 0.01$, Tukey's range test: $p < 0.001$ für SAG 34-1B – CCAP 34/6 und $p < 0.05$ für SAG 34-1B – CCALA 793 und SAG 192.80).

Tabelle 2: Vergleich der zwei Nährmedien; Zelldichte pro ml von *H. pluvialis* nach 31 Tagen Inkubationszeit, Wachstumsrate pro Tag und Verdoppelungszeit während der Wachstumsphase (die ersten 7 Tage)

	OHM			3N-BBM+V		
	Max. Zellen/ml	Wachstumsrate/d	Verdoppelungszeit [d]	Max. Zellen/ml	Wachstumsrate/d	Verdoppelungszeit [d]
<i>SAG192.80</i>	3'583'333	74%	1.25	1'362'500	58%	1.52
<i>SAG 34-1B</i>	3'637'500	77%	1.22	1'335'417	58%	1.52
<i>CCAP 34/6</i>	3'783'333	85%	1.13	1'154'167	65%	1.39
<i>CCALA793</i>	3'883'333	76%	1.22	1'202'083	77%	1.22

Tabelle 3: Vergleich des pH der zwei Nährmedien zu Beginn und am Schluss (die letzten vier Tage)

	OHM		3N-BBM+V	
	pH Start	pH Schluss	pH Start	pH Schluss
<i>SAG192.80</i>	7.6	7.0	7.3	7.8
<i>SAG 34-1B</i>	7.5	7.7	7.3	7.9
<i>CCAP 34/6</i>	7.6	7.1	7.3	7.5
<i>CCALA793</i>	7.5	7.1	7.3	7.8

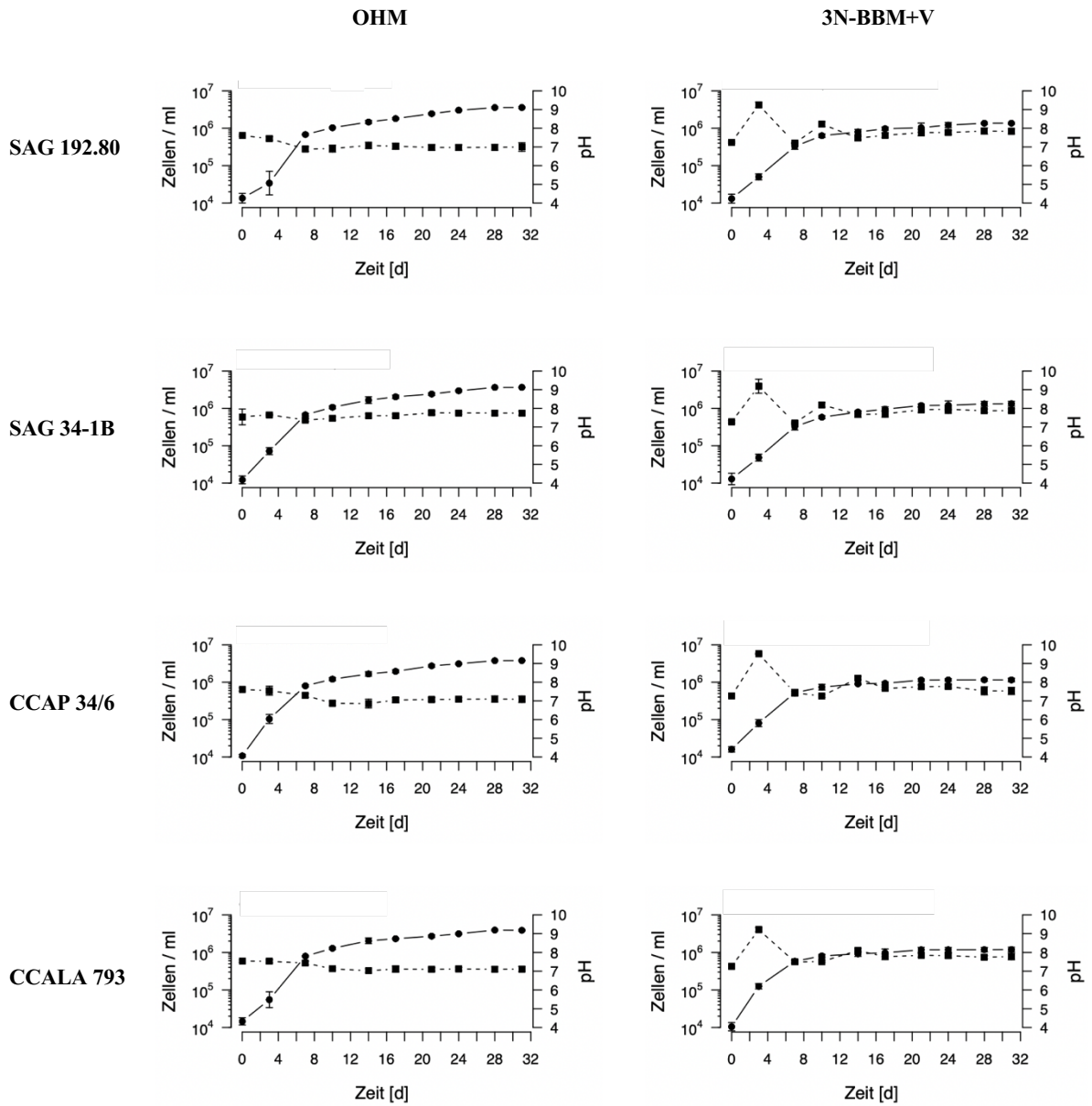


Abbildung 2: Entwicklung der Zelldichte (Kreise und durchgezogene Linie) von *H. pluvialis* und des pH (Quadrate und punktierte Linie) bei unterschiedlichen Nährmedien und Stämmen während 31 Tagen

1.5. Grössenverteilung

Die Grössenverteilung der Zellen in der Kultur veränderte sich im Verlauf der Stressphase. Es kam zu einer Verschiebung der Zell-Durchmesser von kleinen Zellen zu grossen Zellen (Abbildung 3). Die Zellen waren zu Beginn (Tag 0 und 3) alle etwa gleich gross (Median = 20.9 μm , 75 % aller Zellen mit Durchmesser zwischen 18 und 24 μm). Es gab während dieser Phase einige kleinere Zellen (19 %, 9-18 μm) und nur wenige grössere (6 %, 25-28 μm). 7 bis 10 Tage nach der Stressinduktion war jedoch die Grössenverteilung der Zellen sehr breit gestreut (Median₇ = 19.4 μm bzw. Median₁₀ = 20.6 μm). So waren neben den kleineren Zellen (44 bzw. 41 %, 8-18 μm) und etwa gleich vielen mittleren Zellen (49 %, 9-18 μm) auch vereinzelt grosse Zellen (7 bzw. 9 %, 30-40 μm) vorhanden. Nach 14 Tagen liegt der Median bei 25 μm (32 %, 20-27 μm). Es gab auch einige kleinere Zellen (25 %, 15-23 μm), grössere Zellen (74 %, 23-35 μm) und einige sehr grosse Zellen (1 %, 35-40 μm).

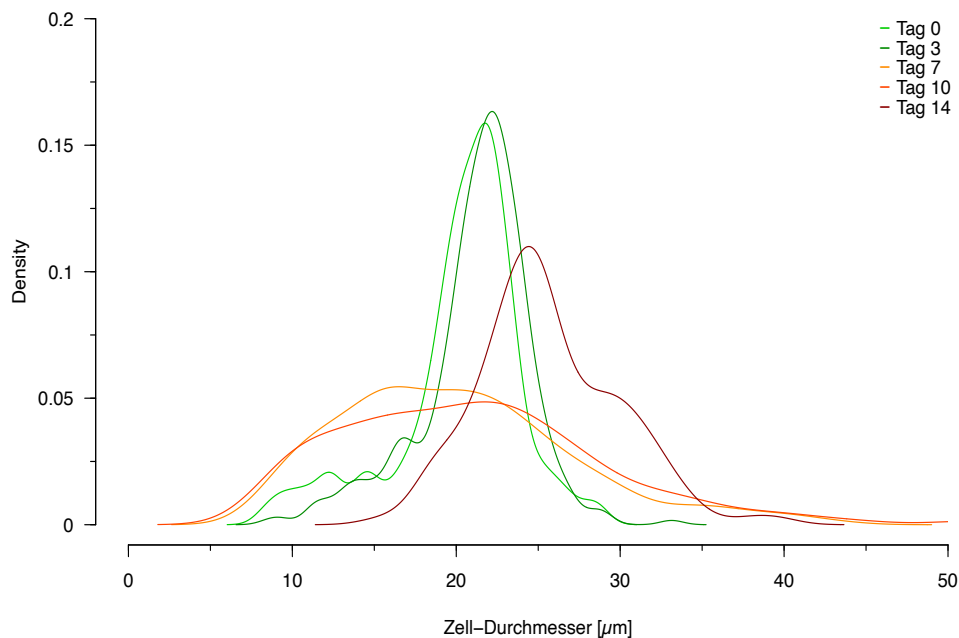


Abbildung 3: Zellgrössen-Verteilung von *H. pluvialis* im Verlauf von 14 Tagen nach Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums

1.6. Rot-Verfärbung

In denjenigen Kulturen bei denen die Astaxanthin-Bildung mittels nährstoffarmen Mediums induziert wurde, konnte über 14 Tage eine deutliche Zunahme der Rot-Verfärbung der *H. pluvialis*-Zellen festgestellt werden. In der Abbildung 4 sowie in der Abbildung 5a ist ersichtlich, dass unmittelbar nach der Stressinduktion (Tag 0) alle Zellen noch grün waren (Rot-Anteil = 0.14 Flächenprozent). Während am Tag 3 und 14 die Zellen alle einen relativ ähnlichen geringen bzw. hohen Rot-Anteil haben (Tag 3 = 1.99 %, Tag 14 = 94.63 %) finden wir dazwischen eine Übergangsphase mit einer wesentlich grösseren Vielfalt an unterschiedlichen Zuständen (Abbildung 5b). Dies weist darauf hin, dass die Astaxanthin-Akkumulation in verschiedenen Zellen zeitlich verschoben stattfindet. Schlussendlich braucht es aber 14 Tage, bis die Akkumulation abgeschlossen ist (Abbildung 5c), während sie am Tag 10 ganz klar noch nicht soweit ist.

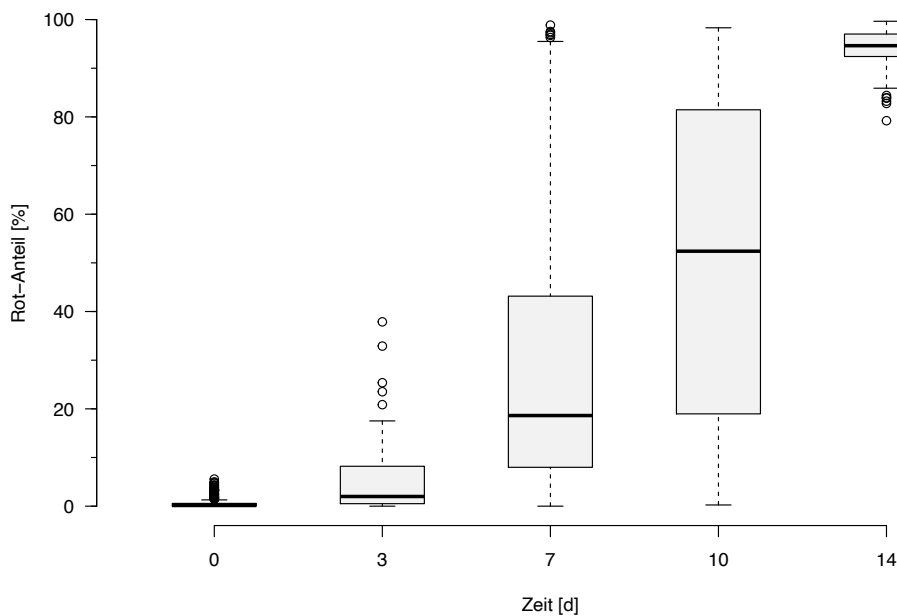


Abbildung 4: : Rot-Verfärbung (in Flächenprozent) von *H. pluvialis* nach 0 bis 14 Tagen nach der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums

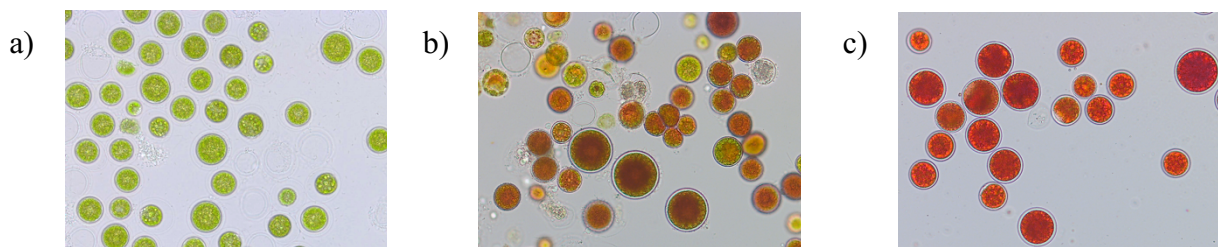


Abbildung 5: eigene Aufnahmen mit dem Mikroskop (20-fache Vergrößerung) von *H. pluvialis* während der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums; a) Start, b) nach 7 Tagen, c) nach 14 Tagen

1.7. Astaxanthin-Gehalt

Über 14 Tage konnte eine deutliche Zunahme des Astaxanthin-Gehaltes festgestellt werden. Der Rot-Anteil ist ein guter Vorhersager für den Astaxanthin-Gehalt von *H. pluvialis*-Zellen. Der Astaxanthin-Gehalt zeigt einen engen linearen Zusammenhang mit der Rot-Anteil der Zellfläche (Abbildung 6a, $R^2 = 0.9885$, $F_{2,3} = 258.5$, $p < 0.01$). Er lässt sich damit über die lineare Gleichung Astaxanthin-Gehalt [mg/g] = $5.9854 + 19.2006 \cdot \text{Rot-Anteil [Flächen-\%]}$ beschreiben. Wenn anstelle der Zellfläche jedoch der Rot-Anteil in Volumenprozent gegeben ist (Abbildung 6b), ist nach wie vor ein linearer Zusammenhang gegeben, der jedoch weniger deutlich ist ($R^2 = 0.9174$, $F_{2,3} = 34.33$, $p = 0.028$).

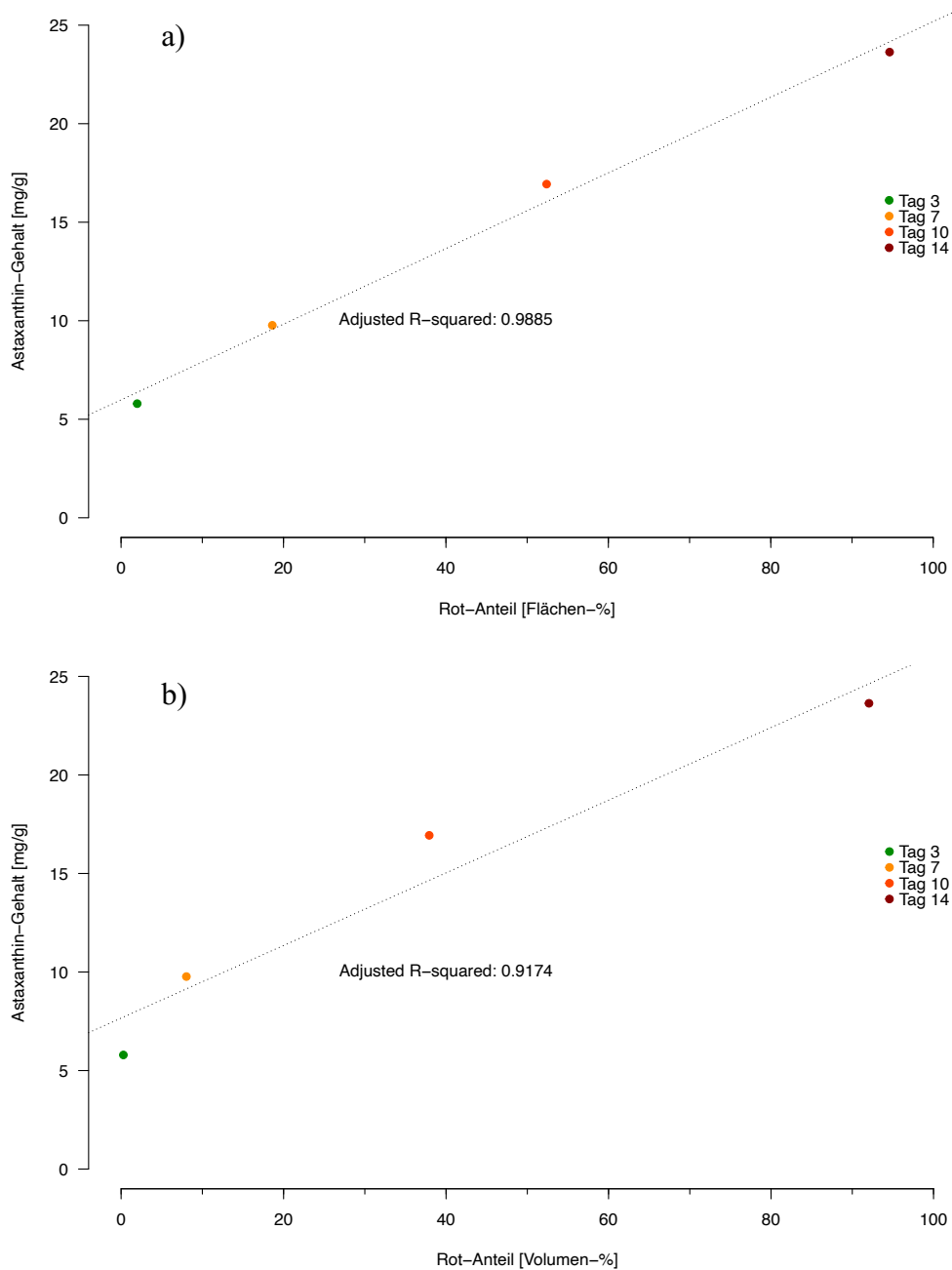


Abbildung 6: Astaxanthin-Gehalt (in mg/g) und Rot-Verfärbung a) in Flächenprozent und b) in Volumenprozent von *H. pluvialis* nach 3 bis 14 Tagen nach der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums. Die gestrichelte Linie zeigt die lineare Regressionsgerade

1.8. Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum der Algensuspension veränderte sich im Verlauf der Stressphase. Es kam zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 411 nm zu 475 nm (Abbildung 7). Zu Beginn (Tag 3) zeigte sich ein Maximum bei 411 nm. 7 bis 10 Tage nach der Stressinduktion nahm der Peak bei 411 nm kontinuierlich ab und das Absorptionsmaximum lag nun bei 475 nm. Nach 14 Tagen allerdings war nur noch ein Maximum bei 475 nm erkennbar und das Absorptionsspektrum glich jetzt dem Spektrum der Standardlösung (reines Astaxanthin).

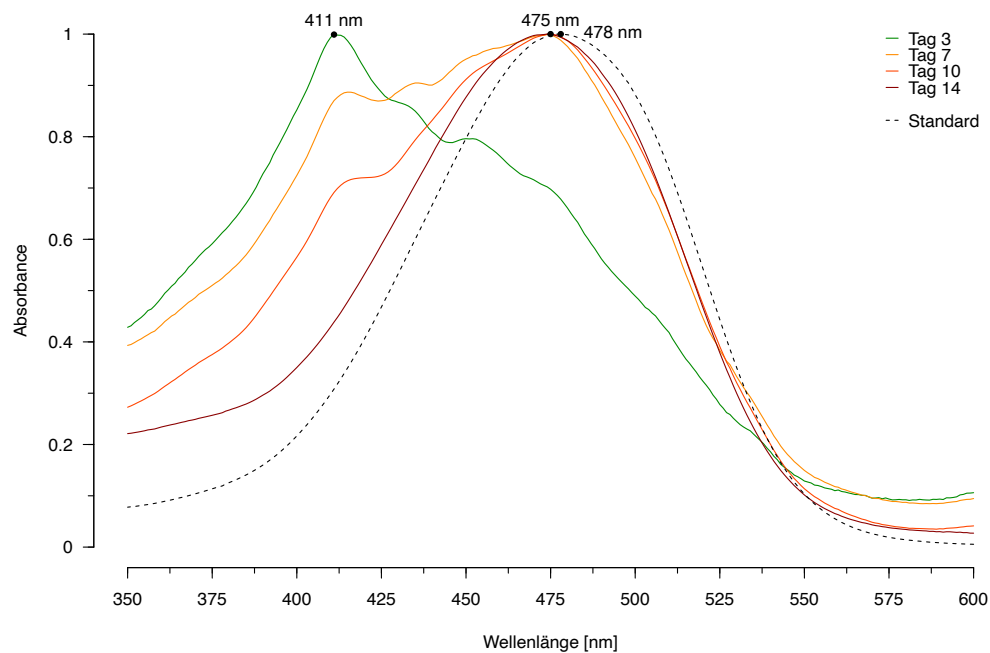


Abbildung 7: Absorptionskurven mit den Maxima von *H. pluvialis* nach 3 bis 14 Tagen nach der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums. Die gestrichelte Linie zeigt die Absorptionskurve von reinem Astaxanthin (Standard)

Diskussion

Bei allen kultivierten Stämmen von *H. pluvialis* konnte nach 31 Tagen Inkubationszeit im OHM ein etwa dreimal besseres Wachstum festgestellt werden als im 3N-BBM+V (Abbildung 2 und Tabelle 2). Damit konnte bestätigt werden, dass das Nährmedium OHM besser geeignet ist als 3N-BBM+V (Fábregas et al., 2000). Die höhere Konzentration bzw. die zusätzlichen Mikronährstoffe könnten für das bessere Wachstum verantwortlich sein. Vor allem Selen und Chrom führen wahrscheinlich zu dieser erhöhten Biomasse-Produktion (Tripathi et al., 1999). Es zeigte sich jedoch, dass die Wahl des Stammes keinen wesentlichen Einfluss auf die maximale Zellzahl, die Wachstumsrate und die Verdoppelungszeit in den beiden Nährmedien hat. Zwar sind Wachstums-Unterschiede zwischen Stämmen nachgewiesen worden, jedoch gibt es nach meinem Wissen keine Studie, die bestätigt, dass es einen Zusammenhang zwischen Nährmedium und *H. pluvialis* Stamm gibt. Beispielsweise gibt es Stämme, die auch bei sehr niedriger Temperatur (8 bis 10 °C) wachsen können (Klochkova et al., 2013). Ebenfalls gibt es Stämme, die zwar ein verbessertes Transkribieren der Carotinoide- und Wachstums-Gene zeigen, aber auch hier konnte kein gesteigertes Wachstum oder Akkumulieren von Astaxanthin aufgezeigt werden (Gao et al., 2015). Auch konnten durch EMS-Mutagenese keine Mutanten generiert werden, die in ihrem Wachstum oder in ihrer Astaxanthin-Produktion verändert waren (Çebi, 2017).

Der pH sank im OHM nach 31 Tagen Inkubationszeit leicht, im 3N-BBM+V jedoch nahm er nach anfänglichen starken Schwankungen zu (Tabelle 3). Der Einfluss der CO₂-Athmosphäre könnte diesen leichten Rückgang erklären, denn löst sich CO₂ im Nährmedium, so reagiert es mit dem darin enthaltenden Wasser und produziert Kohlensäure ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$) (Galloway & Krauss, 1961). Den leichten Anstieg (von 7.3 auf 7.5 bis 7.9) und die starken Schwankungen des pH während der Wachstumsphase im 3N-BBM+V können so jedoch nicht erklärt werden. Allerdings konnte bei der Grünalge *Scenedesmus dimorphus* auch ein solches Verhalten des pH im Nährmedium BBM aufgezeigt werden (Ali et al., 2014). Der Anstieg und die starken Schwankungen könnten hier auf Absonderungen und Stoffwechsel-Metaboliten von *Scenedesmus dimorphus* zurück zu führen sein (Ali et al., 2014). Vielleicht ist dies auch bei *H. pluvialis* der Fall.

Die Zunahme der Zellgrößen während der Stressphase entspricht der in der Literatur beschriebener Folge der Astaxanthin-Akkumulation als Schutzmechanismus gegen eine lebensfeindliche Umgebung (Jannel et al., 2020). In einer ungestressten, wachsenden Kultur finden sich vor allem Zellen mit einem Durchmesser um die 20 μm , die auch hier nachgewiesen worden sind (Abbildung 3 und 4). Dabei handelt es sich um grüne, vegetative und begeisselte Makrozooid-Zellen (Han et al., 2013; Shah et al., 2016). Die Zellen mit einem kleineren Durchmesser (10-20 μm) sind neu durch Mitose entstandene Tochterzellen (Kobayashi et al., 1997; Wayama et al., 2013). Wegen des immer grösser werdenden Nahrungs- und Energie-Mangels verlieren die Makrozooiden ihre Geissel, vergrössern ihr Volumen und beginnen Astaxanthin zu produzieren (Hagen et al., 2002; Kobayashi et al., 1997). Die Umwandlung ins Dauerstadium (Aplanospore) ist nach 14 Tagen bei allen Zellen abgeschlossen und sie sind nun ausnahmslos rot gefärbt (Abbildung 5). Während dieses Wandels sind sowohl Aplanosporen, als auch begeisselte Makrozooid-Zellen vorhanden (Han et al., 2013) und erklären somit die breit gestreute Größenverteilung und die grosse Spannbreite der Rot-Verfärbung (Kim et al., 2020).

Der Rot-Anteil ist ein guter Vorhersager für den Astaxanthin-Gehalt von *H. pluvialis*-Zellen (Abbildung 6a). Der lineare Zusammenhang kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden: Astaxanthin-Gehalt [mg/g] = $5.9854 + 19.2006 \cdot \text{Rot-Anteil [Flächen-\%]}$. Dabei ist der Rot-Anteil als Flächenprozent ($R^2 = 0.9885$) besser geeignet als die Rot-Verfärbung in Volumenprozent ($R^2 = 0.9174$). Astaxanthin wird in den *H. pluvialis*-Zellen in Form von vielen kleinen Öl-Tröpfchen abgelagert (Aflalo et al., 2007). Diese Öl-Tröpfchen sammeln sich um den Zellkern in der Zellmitte an. Dabei ordnen sie sich nicht in einem perfekten Kreis an (Shah et al., 2016). Wurde in der Bildanalyse mit Volumenprozent gerechnet, wurde jedoch eine kreisförmige Astaxanthin-Verteilung angenommen. Wenn man mit Flächenprozent rechnet, wird die Regression genauer und der Astaxanthin-Gehalt kann besser geschätzt werden. Einen linearen Zusammenhang zwischen Rot-Anteil und Astaxanthin-Gehalt wurde bisher mithilfe von Nahinfrarotspektroskopie (Liu et al., 2015) und Durchflusszytometrie (Chen et al., 2017) aufgezeigt. Mir ist jedoch keine Studie bekannt, in der eine Regressionslinie mithilfe einer Bildanalyse bestimmt wurde.

Ausserdem verändert sich das Absorptionsspektrum der Algensuspension im Verlauf der Stressphase. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 411 nm zu 475 nm (Abbildung). Der Peak bei 411 nm zu Beginn der Stressphase könnte auf das Chlorophyll a zurückzuführen sein, das sein Absorptionsmaximum bei 410 bis 430 nm hat (Burson et al., 2018; Rüdiger & Grimm, 2006). Die *H. pluvialis*-Zellen akkumulieren im Verlauf der Stressphase immer mehr Astaxanthin, um sich gegen die lebensfeindlichere Umgebung zu schützen (Jannel et al., 2020). Dabei werden die Chloroplasten langsam abgebaut (Wayama et al., 2013). Deshalb ist nach 14 Tagen kein Absorptionsmaximum bei 411 nm erkennbar, sondern ein Peak bei 475 nm feststellbar. In der Literatur finden sich Werte für cis-Astaxanthin (470 nm) (Yuan & Chen, 1997) und für trans-Astaxanthin (478 nm) (Weber et al., 2007). Das verwendete Astaxanthin der Standardlösung (478 nm) lag somit als trans-Astaxanthin vor und das Astaxanthin in den Algenkulturen sehr wahrscheinlich als Gemisch der beiden Isomeren.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass für die Kultivierung von *H. pluvialis* das Nährmedium OHM besser geeignet ist (dreimal besseres Wachstum) als 3N-BBM+V. Ausserdem zeigte sich, dass die Wahl des Stammes keinen wesentlichen Einfluss auf die maximale Zellzahl, die Wachstumsrate und die Verdoppelungszeit hat. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich der pH im OHM konstanter als im 3N-BBM+V verhält. Mit dem Erfassen der Parameter Zelldichte, Wachstumskurve und Rot-Färbung mit dem Programm Fiji konnte der Astaxanthin-Gehalt geschätzt werden. Mit dem Vergleich mit der UV/VIS-Standardkurve konnte der genaue Astaxanthin-Gehalt in mg/g ermittelt werden und ein linearer Zusammenhang mit dem Rot-Anteil aufgezeigt werden. Es zeigte sich, dass mit dem Rot-Anteil in Flächenprozent der Astaxanthin-Gehalt in mg/g besser geschätzt werden kann, als mit dem Rot-Anteil in Volumenprozent. Mit weiteren Untersuchungen in dieser Richtung, beispielsweise eine grössere Anzahl an Proben, könnte die gefundene Gleichung weiter verfeinert und gestützt werden. In weiteren Studien und Untersuchungen könnten ausserdem verschiedene Methoden (Erhöhung der Lichtintensität, Temperatur, Salzkonzentration, etc.) zur Stressinduzierung untersucht und miteinander verglichen werden. Denn für eine möglichst effiziente und ökonomische Produktion ist die Methoden zur Stressinduzierung essenziell.

Literaturverzeichnis

- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., & Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two- vs. One-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 300–305. <https://doi.org/10.1002/bit.21391>
- Ali, H. A. A.-S., Ehsan, A., Najeeb, K. N. A.-S., & Mohd, S. K. (2014). Growth of *Scenedesmus dimorphus* in different algal media and pH profile due to secreted metabolites. *African Journal of Biotechnology*, 13(16), 1714–1720. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13455>
- Arndt, T. (2019). Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 1134–1135). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_1469
- Burchardt, L., Balcerkiewicz, S., Kokociński, M., Samardakiewicz, S., & Adamski, Z. (2006). Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznań (Poland). *Biodiversity: Research and Conservation*, 1–2, 163–166. <http://brc.amu.edu.pl/Occurrence-of-Haematococcus-pluvialis-Flotow-emend-Wille-in-a-small-artificial-pool,121566,0,2.html>
- Burson, A., Stomp, M., Greenwell, E., Grosse, J., & Huisman, J. (2018). Competition for nutrients and light: Testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. *Ecology*, 99(5), 1108–1118. <https://doi.org/10.1002/ecy.2187>
- Çebi, Z. (2017). *Efficient microscale screening of various Haematococcus pluvialis strains for growth and astaxanthin production* [Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln]. <https://kups.ub.uni-koeln.de/7642/1/Dissertation-USB.pdf>
- Chen, J., Wei, D., & Pohnert, G. (2017). Rapid Estimation of Astaxanthin and the Carotenoid-to-Chlorophyll Ratio in the Green Microalga *Chlorella zofingiensis* Using Flow Cytometry. *Marine Drugs*, 23. <https://doi.org/10.3390/md15070231>
- Choubert, G., Mendes-Pinto, M. M., & Morais, R. (2006). Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*, 257(1–4), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.055>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella ssp.*) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811–826. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>
- Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., & Otero, A. (2000). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 530–535. <https://doi.org/10.1007/s002530051652>
- Galloway, R. A., & Krauss, R. W. (1961). The Effect of CO₂ on pH in culture Media for Algae. *Plant and Cell Physiology*, 2(3), 331–337. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077689>
- Gao, Z., Meng, C., Chen, Y. C., Ahmed, F., Mangott, A., Schenk, P. M., & Li, Y. (2015). Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1853–1860. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0491-3>
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)

- Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37(2), 217–226. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003669>
- Han, D., Li, Y., & Hu, Q. (2013). Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. In *Handbook of Microalgal Culture* (S. 388–405). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch20>
- Hata, N., Ogonna, 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. <https://doi.org/10.1023/A:1011921329568>
- Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., & Petit, T. (2020). Novel Insights into the Biotechnological Production of *Haematococcus pluvialis*-Derived Astaxanthin: Advances and Key Challenges to Allow Its Industrial Use as Novel Food Ingredient. *Marine Science and Engineering*, 8(10), 789–838. <https://doi.org/10.3390/jmse8100789>
- Kim, Y.-E., Matter, I. A., Lee, N., Jung, M., Lee, Y.-C., Choi, S.-A., Lee, S. Y., Kim, J. R., & Oh, Y.-K. (2020). Enhancement of astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* using magnesium aminoclay nanoparticles. *Bioresource Technology*, 307, 123270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123270>
- Klochkova, T. A., Kwak, M. S., Han, J. W., Motomura, T., Nagasato, C., & Kim, G. H. (2013). Cold-tolerant strain of *Haematococcus pluvialis* (Haematococcaceae, Chlorophyta) from Blomstrandhalvøya (Svalbard). *ALGAE*, 28(2), 185–192. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.185>
- Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M., & Ratte, H. T. (1994). ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water Research*, 28(3), 743–746. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90157-0)
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94–97. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82794-8)
- Kröner, S., & Carbó, M. T. D. (2013). Determination of minimum pixel resolution for shape analysis: Proposal of a new data validation method for computerized images. *Powder Technology*, 245, 297–313. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.04.048>
- Liu, J. H., Song, L., & Huang, Q. (2015). Rapid screening astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* mutants through near-infrared spectroscopy. *Letters in Applied Microbiology*, 7.
- Lu, M., Zhang, Y., Zhao, C., Zhou, P., & Yu, L. (2010). Analysis and Identification of Astaxanthin and its Carotenoid Precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by High-Performance Liquid Chromatography. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 65(7–8), 489–494. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-7-812>
- Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M.-E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(10), 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- Rüdiger, W., & Grimm, B. (2006). Chlorophyll Metabolism, an Overview. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Bd. 25, S. 133–146). Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4516-6_10

- Sarada, R., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37(6), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00246-1).
- Schulze, K., López, D. A., Tillich, U. M., & Frohme, M. (2011). A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and ImageJ. *BMC Biotechnology*, 11(1), 118. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-118>
- Shah, Md. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., & Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters*, 16(2), 133–138. <https://doi.org/10.1007/BF01021659>
- Tripathi, U., Sarada, R., Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (1999). Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197–199. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00143-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00143-6)
- Trommler, K. (2005). *Labor- und halbtechnische Untersuchungen zur Entwicklung eines Algenreaktors für die Anreicherung von Methan in Biogasen der anaeroben Klärschlammfäulung*. Mikrobiologisch-analytisches Labor (MAL) GmbH. https://www.cleaner-production.de/fileadmin/as-sets/bilder/BMBF-Projekte/02WS181A_-_Abschlussbericht.pdf
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., & Kawano, S. (2013). Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8(1), e53618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053618>
- Weber, R. W. S., Anke, H., & Davoli, P. (2007). Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). *Journal of Chromatography A*, 1145(1), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.052>
- Yuan, J.-P., & Chen, F. (1997). Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*, 11(7), 455–459. <https://doi.org/10.1023/A:1018441411746>
- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 158, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.044>

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BEISPIEL DER BILDANALYSE:	5
ABBILDUNG 2: ENTWICKLUNG DER ZELLDICHTE (KREISE UND DURCHGEZOGENE LINIE) VON H. PLUVIALIS UND DES pH (QUADRATE UND PUNKTIERTE LINIE) BEI UNTERSCHIEDLICHEN NÄHRMEDIEN UND STÄMMEN WÄHREND 31 TAGEN	7
ABBILDUNG 3: ZELLGRÖSSEN-VERTEILUNG VON H. PLUVIALIS IM VERLAUF VON 14 TAGEN NACH STRESSINDUKTION MITTELS NÄHRSTOFFARMEN MEDIUMS	8
ABBILDUNG 4: : ROT-VERFÄRBUNG (IN FLÄCHENPROZENT) VON H. PLUVIALIS NACH 0 BIS 14 TAGEN NACH DER STRESSINDUKTION MITTELS NÄHRSTOFFARMEN MEDIUMS	9
ABBILDUNG 5: AUFNAHMEN MIT DEM MIKROSKOP (20-FACHE VERGRÖSSERUNG) VON H. PLUVIALIS WÄHREND DER STRESSINDUKTION MITTELS NÄHRSTOFFARMEN MEDIUMS; A) START, B) NACH 7 TAGEN, C) NACH 14 TAGEN	9
ABBILDUNG 6: ASTAXANTHIN-GEHALT (IN MG/G) UND ROT-VERFÄRBUNG A) IN FLÄCHENPROZENT UND B) IN VOLUMENPROZENT VON H. PLUVIALIS NACH 3 BIS 14 TAGEN NACH DER STRESSINDUKTION MITTELS NÄHRSTOFFARMEN MEDIUMS. DIE GESTRICHELTE LINIE ZEIGT DIE LINEARE REGRESSIONSGERADE	10
ABBILDUNG 7: ABSORPTIONSKURVEN MIT DEN MAXIMA VON H. PLUVIALIS NACH 3 BIS 14 TAGEN NACH DER STRESSINDUKTION MITTELS NÄHRSTOFFARMEN MEDIUMS. DIE GESTRICHELTE LINIE ZEIGT DIE ABSORPTIONSKURVE VON REINEM ASTAXANTHIN (STANDARD)	11

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN NÄHRMEDIEN FÜR DIE KULTIVIERUNG VON H. PLUVIALIS, ANGEPASST FÜR EINEN ZUWACHS VON 3 G/L	3
TABELLE 2: VERGLEICH DER ZWEI NÄHRMEDIEN; ZELLDICHTE PRO ML VON H. PLUVIALIS NACH 31 TAGEN INKUBATIONSZEIT, WACHSTUMSRATE PRO TAG UND VERDOPPELUNGSZEIT WÄHREND DER WACHSTUMSPHASE (DIE ERSTEN 7 TAGE)	6
TABELLE 3: VERGLEICH DES pH DER ZWEI NÄHRMEDIEN ZU BEGINN UND AM SCHLUSS (DIE LETZTEN VIER TAGE)	6

Anhang

1.9. Fiji-Script

Das Fiji-Script ist ausserdem auch als ijm-Datei auf Complexis hochgeladen worden.

```

for (a = 1; a < 16; a++) {
    open("/Users/jonas/Desktop/Bilder/"+a+".png");
}
for (b = 8; b < 16; b++) {

    selectWindow(b+".png");
    run("Set Scale...");
    selectWindow(b+".png");
    run("Duplicate...", "title="+b+"-GanzeZelle.png");
    run("Color Threshold...");
    min=newArray(3);
    max=newArray(3);
    filter=newArray(3);
    a=getTitle();
    run("RGB Stack");
    run("Convert Stack to Images");
    selectWindow("Red");
    rename("0");
    selectWindow("Green");
    rename("1");
    selectWindow("Blue");
    rename("2");
    min[0]=0;
    max[0]=255;
    filter[0]="pass";
    min[1]=0;
    max[1]=255;
    filter[1]="pass";
    min[2]=0;
    max[2]=90;
    filter[2]="pass";
    for (i=0;i<3;i++){
        selectWindow(""+i);
        setThreshold(min[i], max[i]);
        run("Convert to Mask");
        if (filter[i]=="stop") run("Invert");
    }
    imageCalculator("AND create", "0","1");
    imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
    for (i=0;i<3;i++){
        selectWindow(""+i);
        close();
    }
    selectWindow("Result of 0");
    close();
    selectWindow("Result of Result of 0");
    rename(a);

    run("Analyze Particles...", "size=1101.32-52054.75306 show=Masks display exclude clear include");

```

```

run("Read and Write Excel", "file=[/Users/jonas/Desktop/Resultate/Rohdaten.xlsx] sheet=GanzeZelle");
selectWindow(b+".png");
run("Duplicate...", "title="+b+"-RoterAnteil.png");
run("Color Threshold...");
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("RGB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Red");
rename("0");
selectWindow("Green");
rename("1");
selectWindow("Blue");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=90;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
imageCalculator("AND create", "Mask of "+b+"-GanzeZelle.png", ""+b+"-RoterAnteil.png");
selectWindow("Result of Mask of "+b+"-GanzeZelle.png");
run("Analyze Particles...", " show=Outlines display clear");
run("Read and Write Excel", "file=[/Users/jonas/Desktop/Resultate/Rohdaten.xlsx] sheet=RoterAnteil");
}

```

1.10. Rohdaten

Die Daten der Zelldichte und pH-Messungen, der Bildanalyse und der Astaxanthin-Messung sind als Excel-Datei auf Complexis hochgeladen worden.

1.11. R-Script

Das R-Script ist als R-Datei auf Complexis hochgeladen worden.

1.12. Poster

Wachstum verschiedener *H. pluvialis* Stämme in unterschiedlichen Nährmedien und Entwicklung einer neuen Analyse zur Bestimmung des Astaxanthin-Gehaltes

Einleitung

Die weltweit verbreitete einzellige Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Blutregenalge) bildet unter Stressbedingungen das Carotin Astaxanthin. Kommerziell wird Astaxanthin als Farbstoff in der Fischzucht, in der Kosmetikindustrie und als Nahrungsergänzungstoff verwendet. Für eine möglichst effiziente Produktion ist es wichtig, optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen und den besten Erntezeitpunkt mit dem grösstmöglichen Astaxanthin-Gehalt zu erkennen. Deswegen wird in dieser Arbeit die Eignung vom Nährmedium OHM für die Kultivierung verschiedener *H. pluvialis* Stämme untersucht. Ausserdem soll mittels einer Bildanalyse der Astaxanthin-Gehalt geschätzt werden und mit einer UV/VIS-basierten Analyse verglichen werden.

Material & Methoden

Es wurden die *H. pluvialis*-Stämme SAG 192.80, SAG 34-1B, CCAP 34/6, CCALA 793 während 31 Tagen in OHM und in 3N-BBM+V kultiviert. Bei den replizierten Kulturen des Stammes CCALA 793, die im OHM Medium kultiviert wurden, wurde die Stressphase mittels nährstoffarmen Mediums (ADaM) eingeleitet.

Resultate & Diskussion

Es konnte bestätigt werden, dass für die Kultivierung von *H. pluvialis* das Nährmedium OHM besser geeignet ist (dreimal besseres Wachstum) als 3N-BBM+V (Abb. 1). Ausserdem zeigte sich, dass die Wahl des Stammes keinen wesentlichen Einfluss auf die maximale Zellzahl, die Wachstumsrate und die Verdoppelungszeit hat. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich der pH im OHM konstanter als im 3N-BBM+V verhält (Abb. 1). Die Grössen-Verteilung der Zellen in der Kultur veränderte sich im Verlauf der Stressphase. Es kommt zu einer Verschiebung der Zell-Durchmesser von kleinen Zellen zu grossen Zellen (Abb. 2). Mit dem Programm Fiji konnte der Astaxanthin-Gehalt in Volumenprozent geschätzt werden (Abb. 3). Anhand des Vergleichs mit der UV/VIS konnte der genaue Astaxanthin-Gehalt in mg/g ermittelt werden (Abb. 4).

Abbildung 1: Entwicklung der Zellgröße (Kreis) und durchgezogene Linie) von *H. pluvialis* (Stamm CCALA 793) und des pH (Quadrat) und punktierte Linie) bei unterschiedlichen Nährmedien: a) OHM b) 3N-BBM+V

Abbildung 2: Zellgrößen-Verteilung von *H. pluvialis* im Verlauf von 14 Tagen nach Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums

Abbildung 3: Rot-Verfärbung (in Volumenprozent) von *H. pluvialis* nach 0 bis 14 Tagen nach der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums

Abbildung 4: Astaxanthin-Gehalt (in mg/g) und Rot-Verfärbung in Flächenprozent von *H. pluvialis* nach 3 bis 14 Tagen nach der Stressinduktion mittels nährstoffarmen Mediums. Die gestrichelte Linie zeigt die lineare Regressionsgerade.

$$y = 5.99 + 19.20 \cdot x$$

$y = \text{Astaxanthin-Gehalt [mg/g]}$
 $x = \text{Rot-Anteil [Flächen-\%]}$

Das Poster ist ausserdem als pdf-Datei auf Compliesis hochgeladen worden.

21

Erklärung betreffend das selbstständige Verfassen einer Bachelorarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management

Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

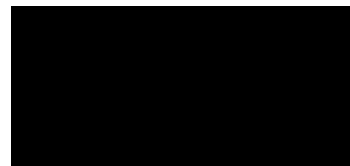
Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Unterschrift

Cham, 08.07.2021



Erklärung betreffend Einwilligung zur elektronischen Veröffentlichung einer Bachelorarbeit auf der ZHAW Digitalcollection

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Arbeit elektronisch gespeichert und in der ZHAW Digitalcollection der ZHAW Hochschulbibliothek öffentlich zugänglich gemacht wird. Das Recht, die Arbeit an anderer Stelle zu veröffentlichen, wird durch diese Erklärung grundsätzlich nicht berührt. Ich bin damit einverstanden, dass die Arbeit, namentlich zum Zweck der Archivierung, in andere Dateiformate konvertiert oder anderweitig technisch verändert wird. Ich versichere, dass der Veröffentlichung der Arbeit keine Rechte Dritter, insbesondere in Bezug auf im Werk enthaltenen Abbildungen, entgegenstehen.

Ort, Datum:

Unterschrift

Cham, 08.07.2021

