

Untersuchungen zur
Astaxanthin-Biosynthese in den Grünalgen
Scenedesmus sp.* und *Haematococcus pluvialis

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diplom-Biotechnologin (FH) Claudia Grewe
geboren am 21. Mai 1979 in Dresden

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß
2. Prof. Dr. Carola Griehl
3. Prof. Dr. Michael Borowitzka

Halle (Saale), 08.05.2009

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2003 bis September 2007 in der AG Biochemie/ Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt in Köthen (Frau Prof. Dr. Carola Griehl) im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens mit der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg (Herrn Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß, Arbeitsgruppe Ökologische Pflanzen-Biochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie).

Die Algenkultivierungen und die bioanalytischen Untersuchungen wurden im Algenbiotechnikum der Hochschule Anhalt in Köthen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Carola Griehl durchgeführt. Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten unter Anleitung von Frau Dr. Sabine Rosahl am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril	DMADP	Dimethylallyldiphosphat
Adonix	Adonixanthin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ANOVA	analysis of variance (Varianz-analyse)	DXP	1-Desoxy-D-Xylose-5-Phosphat
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck)	DXS	D-Xylose-5-phosphat-Synthase
AS	Aminosäure	Echi	Echinenon
AT	Annealing Temperatur	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ax	Astaxanthin	EIC	Extracted Ion Chromatogram
BB	binding buffer	EtOAc	Ethylacetat
BB-T	binding buffer + Triton	FDP	Farsenyldiphosphat
BBM	Bolds Basal Medium	FS	Fettsäure
b-Car	β -Carotin	GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
BKT	β -Carotin-Ketolase	GC	Gaschromatographie
BM	Biomasse	GDP	Geranyldiphosphat
BS	Biosynthese	GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
BSA	bovines Serumalbumin	GGPS	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
Car	Carotinoide	Gln	Gleichung
CarBS	Carotinoid-Biosynthese	GPS	Geranyldiphosphat-Synthase
CD	cirkulärer Dichroismus	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
CDP-ME	4-(Cytidin-5'-diphospho)-Methyl-D-Erythritol	HMBPP	1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-phosphat
CDP-MEP	2-Phospho-4-(Cytidin-5'-diphospho)-Methyl-D-Erythritol	HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
CRTZ	β -Carotin-Hydroxylase	HMG	Hydroxymethylglutarat
CRTW	β -Carotin-Ketolase	IDI	Isopren-Isomerase
CRTI	Phytoen-Desaturase	IDP	Isopentenylidiphosphat
CRTISO	Carotinoid-Isomerase	k	Kapazitätsfaktor
CSP	Chirale Stationäre Phase	kb	Kilobasen
Cx	Canthaxanthin	LB	Luria Bertani Medium
DAD	Dioden-Array-Detektor	LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
DC	Dünnschichtchromatographie	LCYB	Lycopin- β -Zyklase
DE	Diester	LCYE	Lycopin- ϵ -Zyklase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LHC	Light Harvesting Complex (Lichtsammelkomplex)
dNTP	Desoxy-ribonukleosid-triphosphate		

LM	Lösungsmittel	PDS	Phytoen-Desaturase
Lut	Lutein	PSY	Phytoen-Synthase
m/z	Verhältnis Masse/ Ladung	RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
M	Masse	RNA	Ribonukleinsäure
ME	Monoester	ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoff-Verbindungen)
MEP	Methylethanol-4-phosphat	RP	Umkehrphase
MEP-cDP	Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphat	RT-ase	Reverse Transkriptase
MeOH	Methanol	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat-Puffer	SC	Sekundäre Carotinoide
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure	SD	Standardabweichung
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	SDS	Sodium (Natrium) Dodecylsulfat
MS	Massenspektrometrie	SOC	Super Optimal Catabolite Repression Medium
MW	Mittelwert	sp.	Spezies
NAD	Nicotinamiddinucleotid	S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
NADP	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
NMR	Kernresonanzspektroskopie	TE	Tris-EDTA-Puffer
NP	Normalphase	TE-T	Tris-EDTA-Triton-Puffer
NSY	Neoxanthin-Synthase	TAG	Triacylglyceride
OHM	Optimal <i>Haematococcus</i> Medium	TDP	Thiamin-diphosphat
ORF	Open Reading Frame (Offenes Leseraster)	TdT	terminale Desoxy-Transferase
PBR	Photobioreaktor	t _R	Retentionszeit
PC	Primäre Carotinoide	TS	Trockensubstanz
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)	UV	ultraviolett
PDS	Phytoen-Desaturase	VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
PET	Peters Medium	Vis	visuell, sichtbar
PFD	Photonenflussdichte	V _R	Reaktorvolumen
Pfl.	Pflanze	Violax	Violaxanthin
PPDP	Präphytoen-diphosphat	WB	washing buffer (Waschpuffer)
		WB-T	washing buffer + Triton
		ZDS	ξ-Carotin-Desaturase
		ZEP	Zeaxanthin-Epoxidase
		Zeax	Zeaxanthin

1.	Einleitung	1
1.1	Algen	1
1.2	Carotinoide	1
1.2.1	Struktur, Vorkommen und Funktion	1
1.2.2	Biosynthese primärer und sekundärer Carotinoide	3
1.2.3	Carotinoidisomere am Beispiel des Astaxanthins	9
1.2.4	Astaxanthin aus natürlichen Quellen.....	10
1.2.5	Beeinflussung der SC-Biosynthese in Grünalgen durch Stress.....	13
1.2.6	Wirtschaftliche Verwendung der Carotinoide.....	14
1.2.7	Carotinoidanalytik	16
1.2.7.1	Spektrophotometrische Analyse von Carotinoiden.....	16
1.2.7.2	Chromatographische Methoden	17
1.2.7.3	Chiralitätsbestimmung von Astaxanthin	18
1.3	LC-MS-Kopplung	18
1.4	Zielstellung.....	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Mikroorganismen	20
2.2	Chemikalien.....	20
2.3	Medien.....	21
2.4	Kultivierung.....	21
2.5	Ernte und Trocknung.....	23
2.6	Probenvorbereitung	23
2.6.1	Zellaufschluss und Extraktion	23
2.6.2	Isomerisierung des Ax-Standards.....	24
2.7	Analytik	24
2.7.1	Biomassebestimmung.....	24
2.7.2	UV/Vis-Spektroskopie	24
2.7.3	DC	24
2.7.4	HPLC.....	25
2.7.5	MS und LC-MS	26
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.8.1	RNA-Isolierung	27
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.8.3	PCR	28

2.8.4	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.8.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	31
2.8.6	Klonierung	31
2.8.7	Transformation in kompetente Zellen	32
2.8.8	Plasmidpräparation	32
2.8.9	Restriktionsverdau	32
2.8.10	Sequenzierung und Sequenzanalyse	32
2.8.11	Northern-Blot	33
2.9	Statistische Analyse	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Analyse der Sekundär-carotinoide phylogenetisch verwandter Mikroalgen	34
3.2	Klonierung eines β -Carotin-Ketolase-Gens (<i>BKT</i>) aus <i>Scenedesmus</i>	39
3.3	Analytik der Carotinoide	44
3.3.1	<i>Ax-Z,E</i> -Isomere	44
3.3.2	<i>Ax-R,S</i> -Isomere	45
3.3.3	LC-MS-Analyse von Carotinoiden und Carotinoidestern	48
3.3.3.1	Carotinoid-Referenzsubstanzen	48
3.3.3.2	Carotinoidspektrum in <i>Haematococcus pluvialis</i>	50
3.3.3.3	Carotinoidspektrum in <i>S. rubescens</i>	53
3.4	Physiologie der <i>Ax</i> -Biosynthese in <i>H. pluvialis</i> und <i>S. rubescens</i> unter Stress....	55
3.4.1	Wachstum und SC-Gehalte in <i>H. pluvialis</i> und <i>S. rubescens</i>	55
3.4.2	Medien-abhängige Veränderung der Pigmentzusammensetzung in <i>H. pluvialis</i> ..	57
3.4.3	Veränderung der Pigmentzusammensetzung in <i>S. rubescens</i>	60
3.5	Steigerung der Astaxanthin-Ausbeute	63
3.5.1	Lichtquantität und -qualität	63
3.5.2	Salzeinfluss	65
3.5.3	Vorstufen der Carotinoid-Biosynthese	67
4.	Diskussion	69
4.1	Sekundär-carotinoidzusammensetzung der Mikroalgen im Screening nach Stressexposition	69
4.2	<i>Z,E</i> -und <i>R,S</i> -Isomere des Astaxanthins	76
4.3	LC-APCI-MS-Analytik der Carotinoide	78
4.4	Veränderungen der Morphologie und des Carotinoidspektrums in <i>H. pluvialis</i> und <i>S. rubescens</i> während der Stressexposition	83

4.5	Klonierung des β -Carotin-Ketolase-Gens (<i>BKT</i>) und Ax-Biosynthese	87
4.6	Steigerung der Ax-Ausbeute in <i>S. rubescens</i> und <i>S. producto capitatus</i>	94
5.	Zusammenfassung und Ausblick	101
6.	Literaturverzeichnis	107
7.	Anhang	121

1. Einleitung

1.1 Algen

Algen stellen botanisch eine paraphyletische Gruppe von Organismen dar, die sich in ihrer Morphologie und Physiologie stark voneinander unterscheiden. Eine Definition dieser Gruppe wird von Graham und Wilcox (2000) wie folgt vorgenommen: „Algen sind (mit zahlreichen Ausnahmen) aquatische Organismen, die (mit häufigen Ausnahmen) photoautotroph Sauerstoff produzieren, und die (mit Ausnahme der Tange) typischerweise kleiner und strukturell weniger komplex als Landpflanzen sind.“ Sie werden im Fünf-Reiche-System den Protista zugeordnet (Whittaker, 1969) und ihr Alter wird auf über drei Milliarden Jahre datiert (Asada, 2003). Die wichtigsten ökologischen Funktionen der phototrophen Organismen sind bis heute die Sauerstoffproduktion und die CO₂-Bindung (Andersen, 2005). Gleichzeitig sind sie die wichtigsten Primärproduzenten der Erde und der Beginn der Nahrungskette in allen aquatischen Lebensräumen (Day et al., 1999). Die Anzahl ihrer Vertreter wird auf über 200.000 Arten geschätzt (Norton et al., 1996). Zu den biochemischen Merkmalen, die für die taxonomische Klassifikation herangezogen werden, zählen vor allem das Vorhandensein und Vorherrschen von Photosynthesepigmenten wie Chlorophylle und Carotinoide. In Algen werden mehr als 100 verschiedene Carotinoide synthetisiert (Liaaen-Jensen und Egeland, 1999), wobei typische Pigmentkombinationen als Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen Klassen genutzt werden (Graham und Wilcox, 2000).

1.2 Carotinoide

1.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion

Carotinoide stellen eine Gruppe von über 700 natürlichen, lipophilen Pigmenten dar, die im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet sind (Fraser und Bramley, 2004). Sie leiten sich von einem C₄₀-Grundgerüst ab, das aus acht Isopreneinheiten aufgebaut ist, und werden zur Klasse der Terpene oder Polyisoprenoide gezählt. Carotinoide besitzen bis zu 15 konjugierten Doppelbindungen, die, zusammen mit zusätzlichen funktionellen Gruppen, Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Lichtes verursachen. Die Chromophore weisen gelbe, orange oder rote Farbtöne auf, die z.B. in Früchten (Orangen), Gemüse (Tomaten), Blumen (Studentenblumen), Vögeln (Flamingos), Insekten (Marienkäfern), Pilzen (Pfifferlingen), Fischen (Lachsen) und marinen Crustaceaen (Hummern) auftreten. Jährlich werden weltweit ca. 100 Millionen Tonnen Carotinoide von Pflanzen, Algen, Bakterien, Pilzen und Hefen *de novo*

synthetisiert (Britton et al., 1995a). Menschen und Tiere müssen die Carotinoide mit der Nahrung aufnehmen.

Carotinoide wurden schon früh aus verschiedenen pflanzlichen Geweben isoliert, wie z.B. β -Carotin aus der Karotte (Wackenroder, 1831) und Xanthophylle (griech. „xanthos“ = gelb und „phyllon“ = Laub) aus Herbstlaub (Berzelius, 1837). Sie werden in reine Kohlenwasserstoffe (Carotine) und ihre oxigenierten Derivate (Xanthophylle) unterteilt (Oliver und Palou, 2000). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach ihrer Physiologie in primäre Carotinoide (PC) und sekundäre Carotinoide (SC). Die wichtigsten Vertreter sind im Anhang A (S. 121) dargestellt.

Primäre Carotinoide (PC) sind in Chlorophyceae („echte“ Grünalgen) und höheren Pflanzen in der gleichen Zusammensetzung enthalten: α -, β -Carotin, Antheraxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin (Britton, 1988). Sie sind in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten meist an Proteine gebunden und nehmen prinzipiell zwei Funktionen in lichtinduzierten Prozessen wahr, die sich grundlegend voneinander unterscheiden: 1. Absorption von Licht (400 bis 570 nm) und Elektronentransfer auf das Chlorophyll a sowie 2. Schutz der Chlorophylle vor photooxidativen Schäden (Demming-Adams et al., 1996). Wie wichtig die letztere Funktion in grünem Gewebe ist, zeigen Versuche mit Carotinoid-defizienten Mutanten, die unter normalen Lichtverhältnissen absterben (Krinsky, 1979). Die Lichtschutzfunktion der PC wird über den Xanthophyllzyklus reguliert (Richter, 1982). Hierbei wird Zeaxanthin bei geringem Lichteinfall durch das Enzym Zeaxanthin-Epoxidase über Antheraxanthin zu Violaxanthin epoxidert (reversible Epoxidierung) und Violaxanthin unter Starklichtbedingungen durch das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase zu Zeaxanthin umgewandelt (reversible Deepoxidierung) (Wilhelm, 1999).

Sekundäre Carotinoide (SC) sind Carotinoide, die in einigen Mikroalgen in großen Mengen akkumulieren, nachdem diese bestimmten Umwelteinflüssen ausgesetzt waren (Eonseon et al., 2003). Bedeutsame Vertreter sind die Ketocarotinoide Astaxanthin (Ax) und Canthaxanthin (Cx), die an der C4-Position des β -Iononringes mit einer Ketogruppe substituiert sind. Sie akkumulieren im Cytosol in Lipidvesikeln (Eonseon et al., 2006) und treten in verschiedenen Grünalgen unter Stickstoffmangelbedingungen auf (Czygan, 1968a). Die Akkumulation der SC, die meist um den Zellkern beginnt, dient dem Schutz der DNA vor Oxidationsschäden (Wang et al., 2003). Ax bewirkt dabei eine Reduzierung der Lichtmenge, die auf die Lichtsammelkomplexe (LHCs) trifft und dient somit als Lichtschutz gegen zu hohe Strahlungintensitäten (Yong und Lee, 1991).

SC verhindern als physikochemische Barriere das Auftreten photodynamischer Schäden durch freie Radikale (Hagen et al., 1993). Ax wirkt dosisabhängig als starkes Antioxidanz ge-

gen ROS (Hussein et al., 2006). Das antioxidative Potenzial des Ax ist dabei höher als das von α -Tocopherol (Chitchumroonchokchai et al., 2004) und β -Carotin (Naguib, 2000).

Da oxidativer Stress ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten von chronischen Krankheiten, wie z.B. Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, Osteoporose und Diabetes, ist, werden die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide, insb. des Ax, als Schlüssel und zentrales Prinzip der Wirkung gegen diese Erkrankungen gesehen (Jyonouchi et al., 2000, Hix et al., 2004, Bhosale und Bernstein, 2005, Rao und Rao, 2007). In klinischen Studien zeigte sich, dass Ax die Entwicklung von Lebermetastasen hemmt (Kurihara et al., 2002), antiinflammatorisch wirkt (Lee et al., 2003), die T-Zellen-Aktivierung unterdrückt (Mahmoud et al., 2004) und den Blutzuckerspiegel senkt (Uchiyama et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus ist die Regulation der interzellulären Kommunikation (über gap junctions), die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose spielt (Tapiero et al., 2004, Vine et al., 2005).

Hydroxylierte Carotinoide treten in der Natur entweder frei (unverestert) oder mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren ($C_n = 12-20$) verestert auf (Fettsäuremono- oder -diester). Durch die Veresterung wird das Molekül stabiler gegenüber oxidativen Abbau (Hussein et al., 2006). Die Veresterung der Carotinoide mit Fettsäuren unterschiedlicher Länge verursacht signifikante Veränderungen der Moleküleigenschaften in Bezug auf Hydrophobizität, Bioverfügbarkeit und Bioaktivität (Mercke Odeberg et al., 2003).

1.2.2 Biosynthese primärer und sekundärer Carotinoide

Die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IDP), dem Grundbaustein aller Carotinoide, verläuft in Grünalgen, im Gegensatz zu höheren Pflanzen ausschließlich über den Mevalonat-unabhängigen, plastidären Methylerithrol-4-phosphat-Weg (MEP-Weg) (Disch et al. (1998), Hoeffler et al. (2002), Fraser und Bramley (2004), Abbildung 1), dieser wurde von Schwender (1996) erstmals in *S. obliquus* nachgewiesen. Hierbei wird Pyruvat, welches aus der Glycolyse stammt, decarboxyliert, an das Coenzym Thiamindiphosphat (TDP) gebunden und auf Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) übertragen. Die Acetylgruppe kondensiert direkt mit GAP zum C5-Zucker 1-Desoxy-D-Xylose-5-phosphat (DXP), katalysiert durch die 1-Desoxy-D-Xylose-5-phosphat-Synthase (DXS). Durch eine Umlagerung und die anschließende Reduktion des DXP entsteht das 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-phosphat (MEP). MEP wird dann über die Zwischenprodukte 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol (CDP-ME), 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol (CDP-MEP), 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (MEP-cDP) und 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-phos-

phat (HMBPP) in IDP und DMADP umgewandelt. Über den MEP-Weg werden ebenfalls Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Phytylkonjugate (z.B. Tocopherole und Phylloquinone) sowie Chlorophylle gebildet.

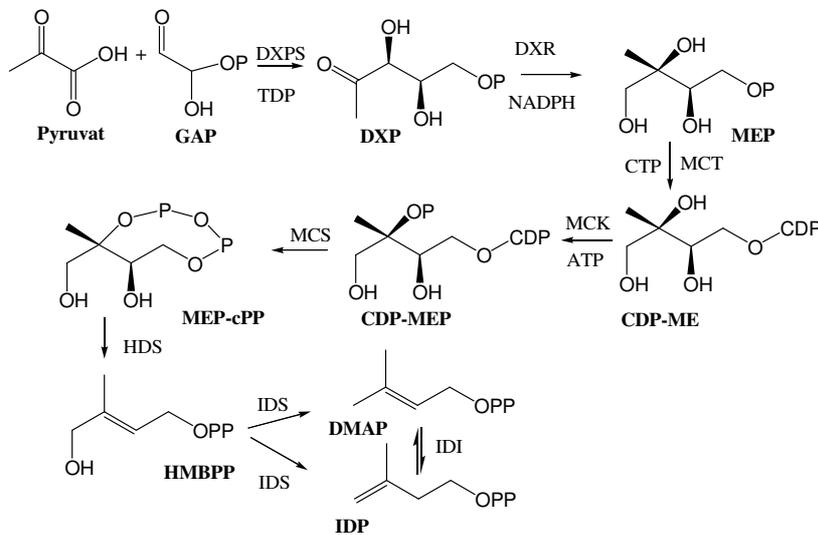


Abbildung 1: Isopren-Biosynthese über den Methylerithrol-4-phosphatweg (Fraser und Bramley, 2004) in *S. obliquus* (Schwender et al., 1996), Abkürzungen s. Text

Der Syntheseweg läuft in den Thylakoidmembranen der Plastiden von Bakterien, Algen und höheren Pflanzen ab (Schwender et al., 1996) und wurde durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren wie z.B. Fosmidomycin aufgeklärt (Hagen und Gruenewald, 2000). Wie alle Terpene entstehen auch die Carotinoide durch eine Kopf-Schwanz-Kondensation eines Moleküls IDP mit einem stereoisomeren Molekül DMADP (Dimethylallyldiphosphat, Abbildung 2). Die Isopren-Isomerase (IDI) katalysiert die reversible Isomerisierung des IDPs. Unter Abspaltung eines Diphosphatrestes kondensieren IDP und DMADP durch eine nucleophile Substitution zum C10-Körper Geranyldiphosphat (GDP). IDP-Isomerase scheint hierbei ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der CarBS in Etioplasten zu sein (Britton et al., 1995b). Zwei weitere IDP-Additionen ergeben über Farnenyldiphosphat (FDP) das Diterpen Geranylgeranyldiphosphat (GGDP, Abbildung 2). Diese Schritte werden von einer Prenyl-Transferase katalysiert. Die Schwanz-Schwanz-Addition von zwei Molekülen GGDP ergibt zunächst das Präphytoendiphosphat (PPDP), woraus das erste farblose Carotinoid, das Phytoen, gebildet wird. Dieses enthält eine zentrale Doppelbindung (C15,15'). Die Bildung von Phytoen wird durch die Phytoen-Synthase (PSY) katalysiert, die in einem Phytoen-Synthase-Komplex integriert ist, der alle carotinogenen Enzyme bis zu diesem Schritt enthält (Camara, 1993). Durch die sukzessive Dehydrogenierung wird das System der konjugierten Doppelbindungen verlängert (Zwischenprodukte sind ξ -Carotin, Proneurosporin und Prolycopin). Das Syntheseprodukt der vier Dehydrogenierungsschritte ist das Lycopin. In Bakterien werden diese Schritte durch nur ein Enzym, die Phytoen-Desaturase (CRTI), katalysiert, in Pflanzen treten

neben der Phytoen-Desaturase (PDS) noch die ξ -Carotin-Desaturase (ZDS) und die Carotinoide-Isomerase (CRTISO) auf (Fraser und Bramley, 2004).

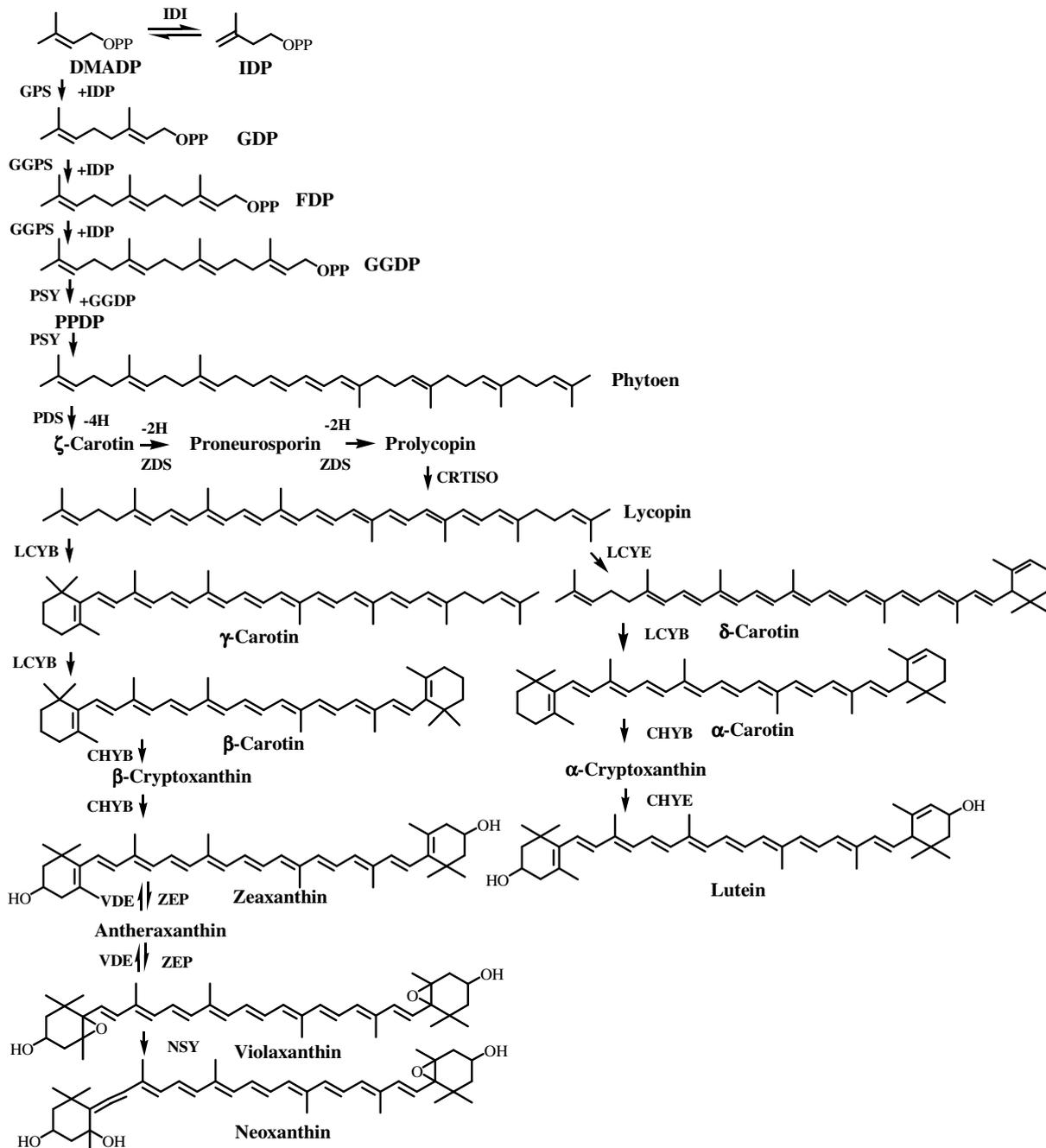


Abbildung 2: Biosynthese der primären Carotinoide (PC) in Pflanzen und Algen aus IDP (verändert nach Fraser und Bramley (2004)), Abkürzungen s. Text

Durch anschließende Zyklisierungen an der Molekülperipherie des Lycopins werden β,β -Carotin (β -Carotin) bzw. β,ε -Carotin (α -Carotin) gebildet. Das System konjugierter Doppelbindungen reduziert die Flexibilität der Kohlenstoffkette und limitiert somit die Möglichkeiten der Faltung, so dass vermehrte Zyklisierungen, unmöglich werden (Britton et al., 1995b). Das β - oder α -Carotin der Grünalgen wird durch die jeweilige Einführung von Hydroxy- und/oder Epoxygruppen in primäre Carotinoide überführt. Der Ablauf der Carotinoide-Biosynthese

erfolgt über die Schritte Dehydrogenierung, Zyklisierung und Einführung von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen, es gibt in der Natur keinen Nachweis für zyklisiertes Phytoen (Britton et al., 1995b).

Die Biosynthese der sekundären Ketocarotinoide verläuft ausgehend vom β -Carotin über die Hydroxylierung und/ oder Ketolierung des β -Carotins (Abbildung 3) über verschiedene Wege. Die katalysierenden Enzyme sind die β -Carotin-Ketolase (BKT) und die β -Carotin-Hydroxylase (CRTZ), deren Bi-Funktionalität von Fraser et al. (1997) nachgewiesen wurde.

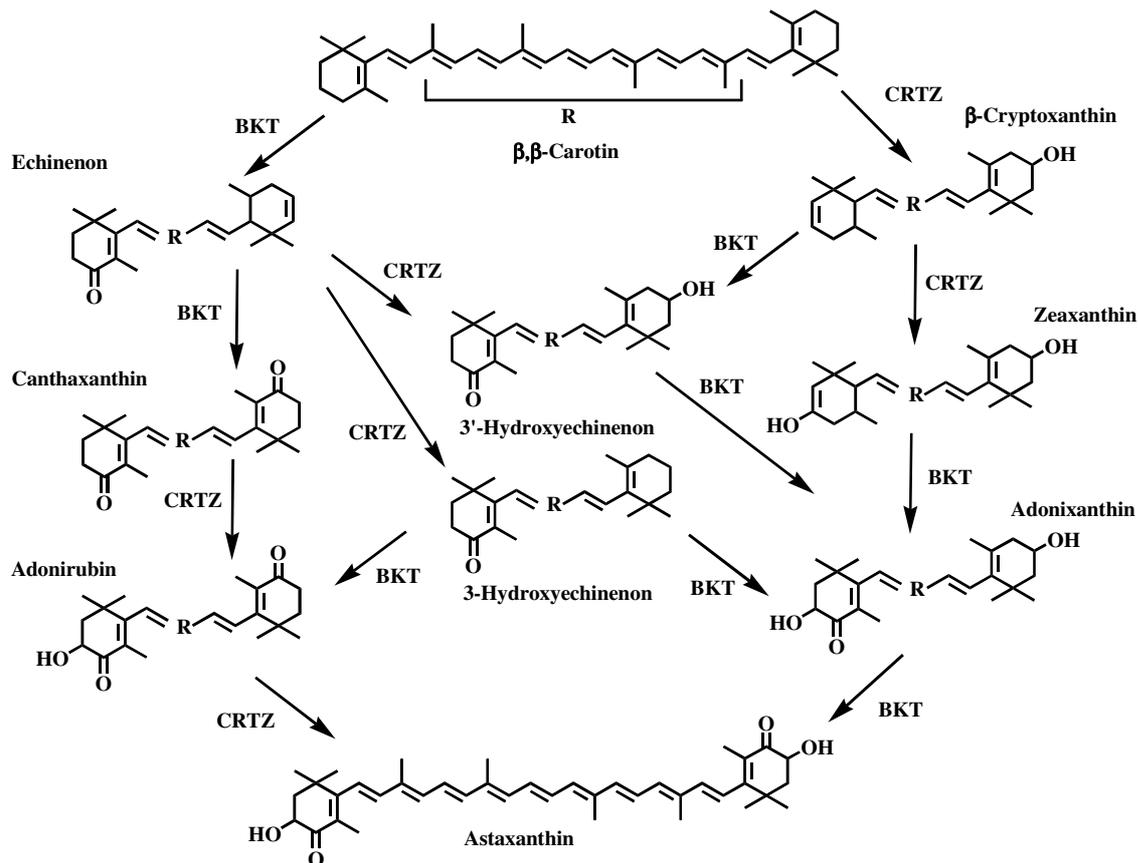


Abbildung 3: Biosynthese der sekundären Carotinoide (SC), (BKT: β -Carotin-Ketolase; CRTW: bakterielle β -Carotin-Ketolase; CRTZ: β -Carotin-Hydroxylase) verändert nach Grünwald et al. (2001) und Morris et al. (2006)

Für die Grünalge *Haematococcus pluvialis* wurde publiziert, dass die Ax-Synthese streng linear über Cx erfolgt (untersucht über die inhibitorischen Effekte von Diphenylamin (Donkin, 1976, Fan et al., 1995)). In *Chlorococcum* sp. wurde der Ax-Biosyntheseweg über Echinenon, 3-Hydroxyechinenon und Adonixanthin vorgeschlagen (Yuan et al., 2002). *Chlorella zofingiensis* bildet Ax über β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Adonixanthin (Rise et al., 1994). Im Bakterium *Agrobacterium auranticum* wurde beschrieben, dass die Biosynthese von Ax abhängig von den Kultivierungsbedingungen entweder über Cx oder Zeaxanthin erfolgen kann (Lee und Zhang, 1999). Die Ax-Biosynthese in *Xanthophyllomyces dendrorhous* verläuft über Echinenon, 3-Hydroxyechinenon und Adonirubin (An und Johnson, 1989).

In *H. pluvialis* wurde durch Grünewald et al. (2000, 2001) gefunden, dass die Aktivität der BKT auf die cytoplasmatischen Lipidvesikel beschränkt ist. Da die PDS, welche an der Bildung von Lycopin beteiligt ist, ausschließlich im Chloroplasten lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass Intermediate wie z.B. das β -Carotin (Substrat der BKT) mittels carotinoidbindenden Proteinen aus dem Chloroplasten ins Cytosol transportiert werden, wo dann die Einführung der Ketofunktionen stattfindet (Grünewald und Hagen, 2001).

Die Organisation und Koordinierung der Carotinoid-Biosyntheseenzyme erfolgt nicht über das ein-Gen-ein-Enzym-eine-Reaktion-Modell. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass weniger Gene isoliert wurden als Schritte in der CarBS auftreten (Bsp. eine Phytoen-Desaturase katalysiert mehrere Dehydrierungsschritte) (Britton et al., 1995b). Man geht von Multienzymkomplexen aus, deren Struktur unbekannt ist und die nach dem Prinzip des Substratchannelings funktionieren. Die Enzyme müssen im Multienzymkomplex so arrangiert sein, dass alle benötigten Schritte in der richtigen Reihenfolge an einer oder an beiden Hälften des Moleküls stattfinden können. Es ist ebenfalls wahrscheinlich, dass ein Schlüsselenzym (wahrscheinlich eines, das sauerstoffhaltige Gruppen einführt und von den anderen dicht umgeben ist) das Zentrum bildet (Cunningham und Gantt, 1998).

Die Isolierung und biochemische Charakterisierung der CarBS-Enzyme hat sich als problematisch erwiesen. Der Hauptgrund hierfür ist ihre geringe Konzentration, auch in Zellen mit hohen Carotinoidgehalten (Britton et al., 1995b). Zusätzlich sind die Enzyme entweder als periphere oder integrale Bestandteile an die Membran gebunden und nach der Isolierung inaktiv. Für ihre Reaktivierung mussten diese in Anwesenheit von Galaktose in Phospholipid-Doppelschichten oder Galaktolipid-Doppelschichten integriert werden (Beyer et al., 1985, Sandmann, 1997). In keinem der Fälle konnte jedoch die 3D-Struktur der Enzyme oder die Enzym-Substrat-Wechselwirkung aufgeklärt werden.

Der Einbau der Biosynthesestufe IDP in β -Carotin konnte von Kreuz et al. (1982) nach Isolierung der membrangebundenen Chromoplasten-Enzyme aus *Narcissus pseudonarcissus* (gelbe Narzisse) gezeigt werden. Aus den Cyanobakterien *Aphanocapsa* und *Synechococcus* wurden Thylakoidmembranfraktionen erhalten, mit deren Hilfe die Dehydrogenierung von Phytoen zu Lycopin nachgewiesen und durch NAD^+ - oder NADP^+ -Zugabe gesteigert werden konnte (Bramley und Sandmann, 1987).

Für die Solubilisierung der membrangebundenen Proteine und ihren *in vitro* Aktivitätsnachweis wurde eine Mischung von Chloroform, Deoxycholat und Phosphatidylcholin und Enzym als optimal ermittelt (Fraser et al., 1998). Fraser et al. (1997) zeigten durch eine Expression

der *CRTW* und *CRTZ* aus *Agrobacterium aurantiacum*, der *CRTZ* aus *Erwinia uredovora* und der *BKT* aus *H. pluvialis* in *E. coli*, dass alle diese Enzyme bifunktional sind und eine Sauerstoff-Abhängigkeit aufweisen. Die Zugabe der Kofaktoren 2-Oxoglutarat, Ascorbinsäure sowie Fe^{2+} steigerte deren katalytische Aktivität. Es wurden jedoch zwischen den Organismen verschiedene Substratpräferenzen für die *CRTZ* nachgewiesen: während die *CRTZ* aus *A. auranticum* bevorzugt Cx in Ax umwandelte, bildete die *CRTZ* aus *E. uredovora* v.a. Zeaxanthin aus β -Carotin. Die *CRTW/BKT*-Enzyme zeigten jedoch keine Substratpräferenzen.

Als eine der wenigen Arbeiten zur Isolierung von Carotinoidbiosyntheseenzymen aus Algen wurde von Beihui et al. (2001) die *in vitro* Biosynthese von Xanthophyllen aus Zellextrakten der Grünalge *Chlorococcum* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass β -Carotin über Echinenon in Cx umgewandelt wird.

Regulation der Carotinoid-Biosynthese

Obwohl bereits verschiedene Kern-codierte Gene Carotinoid-synthetisierender Enzyme identifiziert wurden, ist die Regulation der Carotinogenese in Grünalgen *in vivo* noch weitestgehend unbekannt (Jin et al., 2006). Der Kenntnisstand über die Funktion der einzelnen Gene resultiert vor allem aus Untersuchungen mit dem Pilz *Phycomyces blakesleeanus* (Britton, 1991), dem Bakterium *Erwinia uredovora* (Misawa et al., 1990), dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Cunningham et al., 1993) sowie aus höheren Pflanzen (Lu et al., 2006). Unter den Grünalgen wurde eine Expressionssteigerung des *PSY*- und des *CRTZ*-Gens in *H. pluvialis* (Steinbrenner und Linden, 2001) und des *PSY*-Gens in *D. salina* (Yan et al., 2005) nach Stressexposition v.a. auf mRNA aber auch auf Proteinebene gefunden. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine transkriptionelle (Hoch)-Regulierung der Carotinoid-Biosynthese-Gene *PSY* und *PDS* nach Lichtexposition beobachtet (Bohne und Linden, 2002), welche durch blaues Licht verstärkt wurde. Die Photoregulation der Carotinoid-Biosynthese durch blaues Licht wurden ebenfalls in Pilzen (*Fusarium* sp.) von Rau und Rau-Hund (1977) beschrieben. In *H. pluvialis* konnte gezeigt werden, dass der Redoxzustand des Plastochinon-Pools die transkriptionelle Aktivierung der Carotinoidbiosynthese-Gene vermittelt. Hierbei ist entscheidend, dass nicht nur der spezifische Ax-Biosyntheseweg, sondern auch die gesamte Carotinoidbiosynthese unter der Redoxkontrolle des photosynthetischen Elektronentransports steht (Steinbrenner, 2006)

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die HMG-CoA-Synthase, die HMG-CoA-Reduktase, die IDI1 bzw. IDI2 und die PSY die Ausbeute bestimmenden Enzyme in

vielen carotinogenen Systemen sind (Jin et al., 2006). Aus diesem Grund kommt der Regulation der Enzymaktivität eine Schlüsselfunktion zu.

1.2.3 Carotinoidisomere am Beispiel des Astaxanthins

Die Konfiguration und die Konstitution der Carotinoide sind maßgeblich an deren biologischer Aktivität beteiligt, z.B. an der Provitamin-A-Aktivität, den Absorptionseigenschaften sowie an Farbeffekten. **R,S-Isomere** des Ax existieren aufgrund der beiden stereogenen Zentren in C3- bzw. C3'-Position des β -Iononringes in vier möglichen Konfigurationen: 3*S*,3'*S*, 3*S*,3'*R*, 3*R*,3'*S* und 3*R*,3'*R*. Bei den 3*S*,3'*S*- und 3*R*,3'*R*-Stereoisomerenformen handelt es sich um Enantiomere. Aufgrund der Spiegelbildebene im Zentrum des Moleküls sind die optisch inaktiven meso-Formen 3*S*,3'*R* und 3*R*,3'*S* in ihrer räumlichen Struktur identisch (vgl. Abbildung 4). In der industriellen Chemosynthese entsteht Ax als Stereoisomerengemisch 3*S*,3'*S* Ax, 3*R*,3'*S*-Ax, 3*R*,3'*R*-Ax im Verhältnis 1:2:1. In lebenden Organismen wird das Ax im Gegensatz dazu in hoher Enantiomerenreinheit entweder in der *R,R*- oder der *S,S*-Form gebildet.

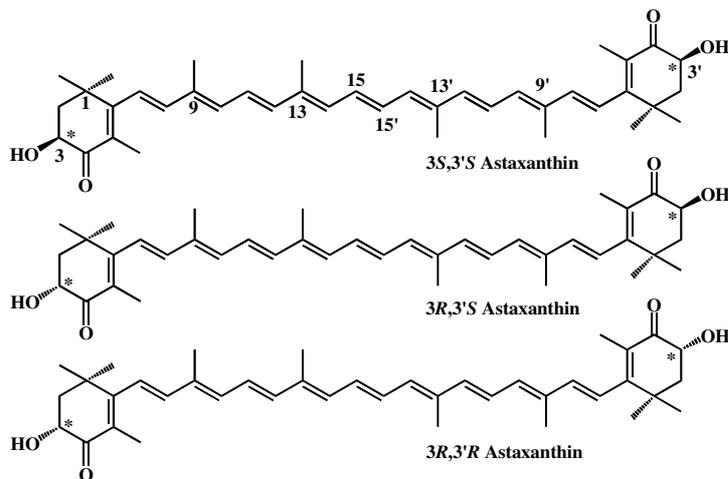


Abbildung 4 : optische (*R,S*) Isomere des Astaxanthins

Aufgrund der zahlreichen Doppelbindungen in Carotinoiden ist zusätzlich eine Vielzahl von **Z,E-Isomeren** möglich (geometrische Isomere). Durch sterische Behinderungen treten stabile Z-Isomere des Ax (s. Abbildung 5) jedoch nur an den Positionen 9, 13 und 15 auf (Bjerkeng et al., 1997).

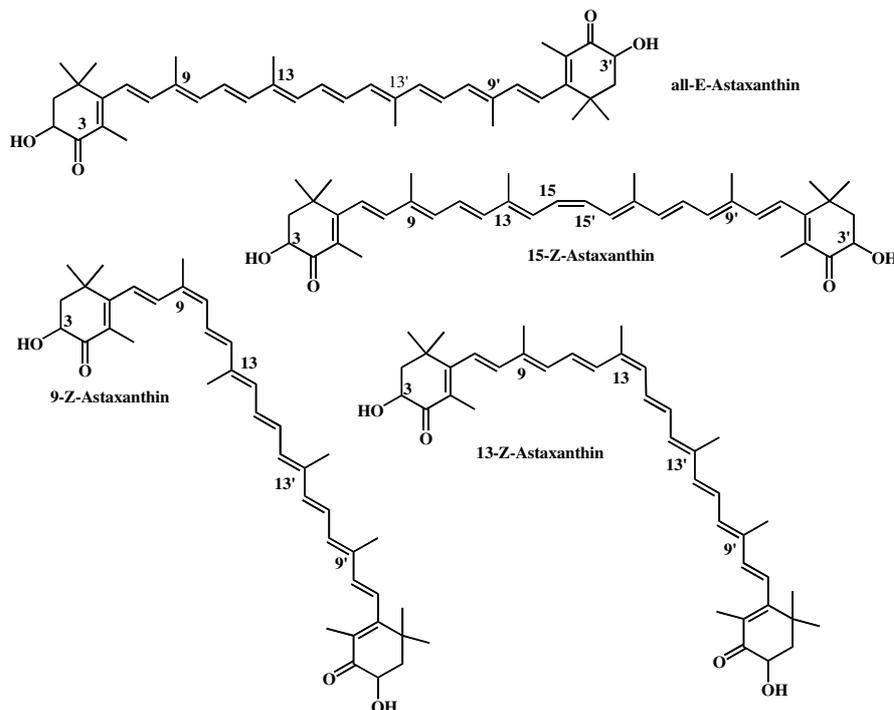


Abbildung 5 : geometrische (Z/E) Isomere des Astaxanthins

Die thermodynamisch stabilste Konformation, die in der Natur am häufigsten vorkommt, ist jedoch die all-*E*-Form (veraltet: all-*trans*). Yuan und Chen (1998) detektierten 97,7% all-*E*-Ax und 1,1% *Z*-Ax in der carotinoidhaltigen Biomasse des *H. pluvialis*. *Z*-Isomerisierungen können leicht durch Energiezufuhr auftreten (Yuan und Chen, 2001). Neben mono-*Z*- wurden in der Natur auch di- und selten tri-*Z*-Formen beobachtet (Isaacson et al., 2004). Je näher die Position des *Z*-Absorptionsmaximums dem Zentrum des Moleküls ist, desto stärker ist die Absorption des *Z*-Peaks ausgeprägt (Zechmeister (1962), vgl. Kapitel 3.3.1, S. 44).

Die *Z/E*- als auch die *R/S*-Isomere akkumulieren nach Aufnahme in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich stark. Nach intraperitonealer Gabe von *Z/E*-Ax bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte von Ytrestoyl und Bjerkeng (2007) eine selektive Akkumulation des *Z*-Isomers in Leber und Niere nachgewiesen werden, wohingegen all-*E*-Ax bevorzugt im Muskel akkumulierte. Das häufig in natürlichen Quellen vorkommende 3*S*,3'*S*-Ax wird selektiv im Organismus akkumuliert (Bowen et al., 2002).

1.2.4 Astaxanthin aus natürlichen Quellen

Ax ist in der Natur weit verbreitet (Lee et al., 2004). Über die Nahrungskette gelangt es aus den Mikroalgen über Zooplankton in aquatische Organismen (in Crustaceen wie z.B: Hummer, Krabben, Shrimps und in Fische wie z.B. Lachs und Forellen), wo es häufig das vorherrschende Carotinoid ist (Higuera-Ciapara et al., 2006). Organismen, in denen die Ax-Synthese beschrieben wurde, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 : Astaxanthin produzierende Organismen

	Organismus	Gehalt/Konz.	Enantiomer	Quelle
Mikroalgen	Chlorophyceae			
	<i>Ankistrodesmus</i> spp.	-	n.b.	(Kessler und Czygan, 1967)
	<i>Chlamydomonas nivalis</i>	-	n.b.	(Remias et al., 2005)
	<i>Chlorococcum</i> sp.	32,2 mg/ L	n.b.	(Zhang und Lee, 2001)
	<i>Coelastrella striolata</i>	1,5 mg/ g	n.b.	(Abe et al. 2005)
	<i>Grasiella vacuolata</i>	1,15 mg/ g	n.b.	(Skoda, 1997)
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	10-98 mg/ g	3S,3'S	(Bowen et al., 2002, Cifuentes et al., 2003, Dominguez-Bocanegra et al., 2004)
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	-	n.b.	(Lubián et al., 2000)
	<i>Neochloris wimmeri</i>	19,2 mg/ g	n.b.	(Orosa et al. 2001)
	<i>Protosiphon botryoides</i>	14,3 mg/ g	n.b.	(Orosa et al. 2001b)
	<i>Scenedesmus</i> sp.		3S,3'S	(Mayer und Czygan, 1969, Grewe et al., 2007)
	<i>komarekii</i>	0,25 mg/ L		(Hanagata und Dubinsky, 1999)
	<i>vacuolatus</i>	2,7 mg/ g		(Orosa et al. 2001)
	<i>obliquus</i>	-		(Hager und Stransky, 1970)
	<i>Scotiellopsis oocystiformis</i>	10,9 mg/ g	n.b.	(Orosa et al. 2001)
	Euglenophyceae			
	<i>Euglena sanguinea</i>	-	n.b.	(Gerber und Häder, 1994)
	Trebouxiophyceae			
	<i>Chlorella</i>		n.b.	(Czygan, 1968a)
	<i>fusca</i> var. <i>rubescens</i>	6,8 mg/ g		(Orosa et al., 2001b)
<i>zofingiensis</i>	12,5 mg/ L		(Ip et al., 2004)	
<i>emersonii</i>	-		(Arad et al., 1993)	
<i>vulgaris</i>	0,5 mg/ g		(Gouveia et al., 1996)	
<i>pyrenoidosa</i>	-		(Krywalska und Skrzypczyk, 1977)	
Ulvophyceae				
<i>Acetabularia mediterranea</i>	-	n.b.	Czezuga 1986	
Pfl.	<i>Adonis anua</i> , <i>A. aestivalis</i> , <i>A. palaestina</i>	-	3S,3'S	(Renstrom et al., 1981)
Hefe	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> <i>Rhodotorula</i> sp. NJ298	1,8 mg/ g -	3R,3'R	(Domínguez-Bocanegra und Torres-Muñoz, 2004, Moretti et al., 2006) (Junling et al., 2007)
Bakterien	<i>Paracoccus haeundaensis</i> (<i>Agrobacterium aurantiacum</i>) <i>Paracoccus carotinifaciens</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Halobacterium salinarium</i>	- - - - -	n.b.	(Misawa et al., 1995, Lee und Kim, 2006) (Tsubokura et al., 1999) (Nelis und De Leenheer, 1991) (Calo et al., 1995)

n.b. nicht bestimmt

H. pluvialis, die natürliche Quelle mit den höchsten Ax-Gehalten, ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung (Droop, 1954, Donkin, 1976, Borowitzka et al., 1991, Boussiba und Vonshak, 1991). Unter physiologischen Bedingungen ist *H. pluvialis* ein Biflagellat (Zelldurchmesser ca. 5 µm), während der Stressexposition verändert sich die Morphologie beträchtlich (Abbildung 6). Unter ungünstigen Umweltbedingungen bildet die Grünalge rote,

unbewegliche, dickwandige Aplanosporen, die im Cytosol in Lipidglobuli akkumulieren und die Ax durchschnittlich in Gehalten von 20 bis 40 mg/ g TS enthalten (Grünwald et al., 2001, Borowitzka, 2005). Das Carotinoid liegt hauptsächlich in Form von Monoestern und Diestern (95%) und nur zu einem geringen Anteil (< 1%) unverestert vor (Lee und Zhang, 1999).

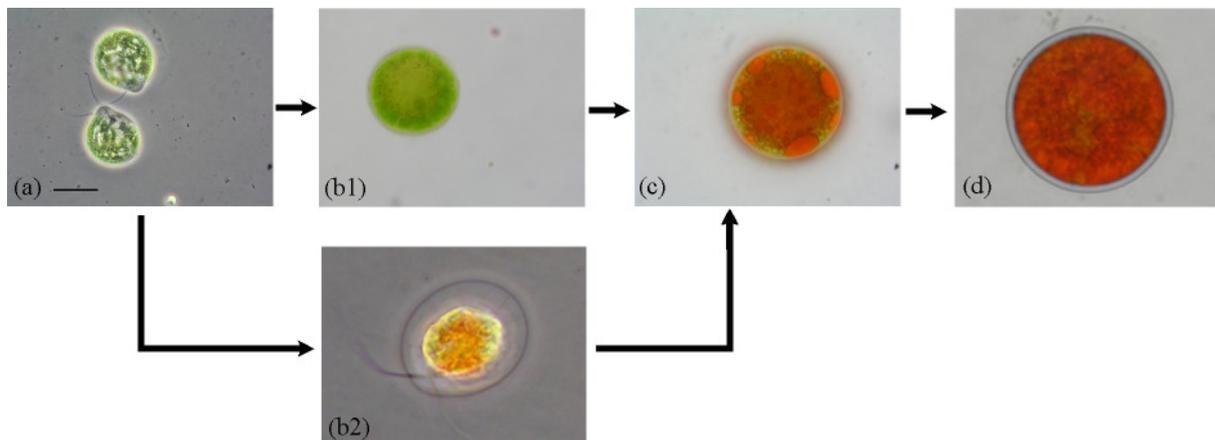


Abbildung 6 : mikroskopische Aufnahme von *H. pluvialis* während der Stressexposition, (a) vegetative Form, (b1) Palmella-Stadium, (b2) Ax-haltige vegetative Form, (c) Übergang in Aplanosporen-Form (d) Aplanospore; Vergrößerung: 1000fach, Maßstab: 5 µm, verändert nach (Boussiba, 2000, Hagen et al., 2000)

Obwohl sich Untersuchungen zur Ax-Produktion in den vergangenen Jahren aufgrund des hohen Gehaltes hauptsächlich auf *H. pluvialis* fokussiert haben, ist Ax in der Klasse der Chlorophyceen weit verbreitet (vgl. Tab. 1 und Lee und Zhang (1999)). Darüber hinaus wurde Ax auch in den Algenklassen Ulvophyceae, Euglenophyceae und Trebouxiophyceae beschrieben. Der Gehalt an sekundären Carotinoiden variiert jedoch innerhalb der Klasse der Chlorophyceae sehr stark, z.B. zwischen 1 mg/ g TS in *Grasiella vacuolata* und 14,3 mg/ g TS in *Protosiphon botryoides* (Orosa et al., 2001b).

Unter den heterotrophen Organismen wurde v.a. die Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* (veraltet: *Phaffia rhodozyma*) untersucht (Johnson, 2003, Libkind et al., 2008). Der Basidomycet erzielt Gehalte von 1,8 mg Ax/ g TS (Domínguez-Bocanegra und Torres-Muñoz, 2004).

Über die Carotinoidgehalte und -zusammensetzung der Gattung *Scenedesmus* sp. wurde bislang nur wenig publiziert. Wenngleich die Fähigkeit dieser Gattung zur SC-Bildung seit vielen Jahren bekannt ist (Kessler und Czygan, 1967), sind bislang nur drei Arten auf ihre Carotinoidbildungseigenschaften hin untersucht und als Quelle für Ax beschrieben worden: *S. komarekii* (Hanagata und Dubinsky, 1999), *S. obliquus* (Burczyk et al., 1981, Qin et al., 2008) und *S. vacuolatus* (Orosa et al., 2001b).

1.2.5 Beeinflussung der SC-Biosynthese in Grünalgen durch Stress

Die SC-Biosynthese in Mikroalgen wird durch verschiedene Umweltbedingungen induziert, die generell für das Wachstum ungünstig sind. Diese werden daher häufig als „Stress“ bezeichnet (Boussiba et al., 1999), definiert als „Umweltbedingung, die ein Ungleichgewicht im Metabolismus auslöst, welche biochemische und metabolische Anpassungsreaktionen erfordert“ (Vonshak und Torzillo, 2003). Der Einfluss verschiedener Stressbedingungen wie z.B. Lichtintensität und Nährstoffmangel auf die SC-Biosynthese wurde in verschiedenen Grünalgen beschrieben (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Stressfaktoren, die eine Induktion der SC-Biosynthese in Mikroalgen bewirken

Stressfaktor	Organismus	Hauptcarotinoide	Quelle
Lichtintensität (1550-1600 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	<i>H. pluvialis</i>	Ax	(Harker et al., 1995)
Lichtspektrum (blaues Licht)	<i>H. pluvialis</i>	Ax	(Kobayashi et al., 1992)
Phosphatmangel (0 mg/L)	<i>H. pluvialis</i>	Ax	(Boussiba et al., 1999) (He et al., 2007)
Nitratmangel (0 mg/L)	<i>H. pluvialis</i> <i>Dunaliella salina</i>	Ax β -Carotin	(Goodwin, 1954, Borowitzka et al., 1991, Boussiba, 2000) (Sanchez-Estudillo et al., 2006)
Natriumacetat (45 mM)	<i>H. pluvialis</i>	Ax	(Huang et al., 2006a)
Metallionen Fe^{2+} (450 μM) Mn^{2+} (400 μM)	<i>H. pluvialis</i>	Ax	(Kobayashi, 1993) (Harker et al., 1996)
Sauerstoffradikale 0,1 mM H_2O_2 0,5 mM Fe^{2+} $^1\text{O}_2$ 0,1 mM H_2O_2	<i>Chlorococcum</i> <i>H. pluvialis</i> <i>C. zofingiensis</i>	Cx, Ax Ax Ax, Cx	(Yin-Nin Ma und Chen, 2001) (Fan et al., 1998) (Ip und Chen, 2005a)
hoher O_2 -Partialdruck 50% v/v 10% v/v	<i>H. pluvialis</i> <i>Chlorococcum</i> sp.	Ax Cx, Ax	(Lee und Ding, 1995) (Liu et al., 2000)
Salzstress (100 mM NaCl, 40 mM KCl) 342 mM NaCl	<i>H. pluvialis</i> <i>C. zofingiensis</i>	Ax Ax, Cx	(Harker et al., 1995) (Harker et al., 1996) (Pelah et al., 2004)
Temperatur (30°C) 35°C 33°C	<i>H. pluvialis</i> <i>Chlorococcum</i> sp. <i>Muriellopsis</i> sp.	Ax Cx, Ax Ax, Cx	(Tjahjono et al., 1994) (Liu und Lee, 2000) (Del Campo et al., 2000)
pH-Wert (5)	<i>Chlorococcum</i> sp.	Cx, Ax	(Liu und Lee, 2000)

Die Untersuchungen waren dabei v.a. auf *H. pluvialis* (Vidhyavathi et al., 2007), *Dunaliella salina* (Sanchez-Estudillo et al., 2006), *Chlorella zofingiensis* (Pelah et al., 2004) und *Chlorococcum* sp. (Zhang und Lee, 2001) fokussiert. Die Stressbedingungen, die eine SC-Biosynthese in Chlorophyceen auslösen bzw. positiv beeinflussen, sind v.a. Nitrat- und Phosphatmangel

(Borowitzka et al., 1991, Boussiba und Vonshak, 1991), hohe Lichtintensitäten (Kobayashi et al., 1992), Trockenstress (Droop, 1954), hohe Salzkonzentrationen (Harker et al., 1996, Kobayashi et al., 1997b), hohe Temperaturen (Tjahjono et al., 1994), reaktive Sauerstoffverbindungen (Kobayashi et al., 1993, Ip und Chen, 2005a) und Acetat (Kobayashi et al., 1993, Dominguez-Bocanegra et al., 2004).

In den meisten bislang beschriebenen Mikroalgenarten wurden Versuche unternommen, um die Carotinoidgehalte durch eine Kombination der o.g. Parameter (Stressfaktoren) zu steigern (Hanagata und Dubinsky, 1999, Fabregas et al., 2000, Masojidek et al., 2000, Cifuentes et al., 2003, Del Campo et al., 2004, Pelah et al., 2004). Trotz dem Einsatz verschiedenster Stressoren (s. Tabelle 2) erhöhte sich der Gesamtcarotinoidgehalt in *Chlorococcum* nur um das 1,1-Fache (Yin-Nin Ma und Chen, 2001), in *Chlorella zofingiensis* um das 1,3-Fache (Ip und Chen, 2005a) und *H. pluvialis* um das 1,3-Fache (Brinda et al., 2004). Ausnahmen stellen die Arbeiten mit *H. pluvialis* dar, in denen der Ax-Gehalt durch den Einsatz von Nitrat- und Phosphatmangel, Starklicht und CO₂ um das 3,4-Fache (Kang et al., 2005) und durch die Verwendung von Malonat um das 13-Fache (pro Zelle) gesteigert wurde (Orosa et al., 2005). Die Kombination der Stressfaktoren erzielte jedoch immer höhere SC-Gehalte, als die Verwendung einzelner Stressbedingungen (Hu, 2003).

1.2.6 Wirtschaftliche Verwendung der Carotinoide

Carotinoide werden gegenwärtig als färbende Zusatzstoffe im Tierfutter und in Lebensmitteln, als Nahrungsmittelergänzung sowie als Zusätze in der Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Sie werden z.T. direkt als Antioxidanzien und als Provitamin A verwendet. Einige Carotinoide sind als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen: β -Carotin (E160a), Annato (E160b), Capsanthin (E160c), Lycopin (E160d), Lutein (E161b) und Cx (E161g) (Rymon Lipinski und Lück, 2006). Die meisten kommerziell erhältlichen Carotinoide wie β -Carotin, Cx und Ax werden gegenwärtig aus einer komplexen Chemosynthese gewonnen (Produzenten: BASF und Hoffmann La Roche). Der weltweite Marktwert an kommerziell eingesetzten Carotinoiden betrug im Jahr 2005 935 Mio. US\$ (s. Tabelle 3, S. 15) und wird 2009 über 1 Milliarde US\$ betragen (BBC Inc., 2004). Im Jahr 2009 wird Ax aufgrund seiner vielfältigen Einsatzmöglichkeiten das Carotinoid mit dem größten Anteil am Weltmarkt sein (sowohl in der Synthese als auch auf dem Fermentationssektor). Es wird dabei v.a. in der Aquakultur (Produktion von Salmoniden und Crustaceaen), in der Eier- und Hühnerproduktion, in der Kosmetik und in der Pharmazie eingesetzt.

Tabelle 3 : Carotinoidweltmarkt 2004 / 2009 sortiert nach Produktionsmethode (BBC Inc., 2004)

Produkt	Synthese	Extraktion	Fermentation	gesamt (US\$)
β -Carotin	184 / 193	46 / 29	12 / 31	242 / 253
Ax	210 / 207	7 / 10	17 / 40	234 / 257
Cx	147 / 154	1 / 2	0 / 0	148 / 156
Lutein	0 / 0	139 / 187	0 / 0	139 / 187
Lycopin	13 / 14	41 / 58	0 / 9	54 / 81
Annatto	0 / 0	33,6 / 39	0 / 0	33 / 39
Zeaxanthin	15 / 24	7 / 11	0 / 0	22 / 35
Apo-carotinal	8,7 / 9,1	0 / 0	0 / 0	8,7 / 9,1
Apo-carotinalester	5,6 / 5,9	0 / 0	0 / 0	5,6 / 5,9
Gesamt	583,3 / 607	274,6 / 336	29 / 80	886,9 / 1023

Für die Lachszucht ist es aufgrund des steigenden weltweiten Konsums von besonderem Interesse. Atlantischer Lachs (*Salmo salar*) akkumuliert 3 bis 11 mg/ kg Ax in seinem Muskelfleisch, welches ihm seine charakteristische rötliche Färbung verleiht (Torrissen et al., 1989). Das Carotinoid bindet hierbei an das myofibriläre Protein α -Actinin im Fischmuskel (Matthews et al., 2006), eine Bindung, die über Wasserstoffbrücken der Hydroxyl- und Keto-Gruppen der Iononringe stabilisiert wird (Schiedt, 1998). Eine unzureichende Aufnahme von Ax führt zwangsläufig zu einem Farbverlust (Storebakken und No, 1992).

Ax aus *H. pluvialis* wird in biotechnologischen Verfahren von verschiedenen Firmen weltweit produziert. Hierbei dominieren geschlossene Photobioreaktoren, einige Produktionsstätten sind in Abbildung 7 dargestellt.



Abbildung 7 : Kommerzielle Ax-Produktion mit *H. pluvialis* (Firmen v.l.n.r.: Micro Gaia, Hawaii; Parry Nutraceuticals, Indien; Alga Tech, Israel; Fotos: S. Boussiba)

Bei der Kultivierung dieser Grünalge zur Ax-Gewinnung treten jedoch häufig Probleme auf (pers. Mitteilung S. Boussiba, Ben Gurion University, Israel), die eine ökonomische Produktion erschweren. Die Wachstumsraten von *H. pluvialis* sind im Vergleich zu anderen Grünalgen sehr gering und daher treten häufig Kontaminationen mit schneller wachsenden anderen Algengattungen wie z.B. mit *Scenedesmus* sp. auf (Garcia-Malea et al., 2005, Joo und Lee,

2007). Die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und Salzkonzentrationen ist sehr gering. *H. pluvialis* ist dennoch die einzige kommerziell verfügbare Mikroalge, die Ax enthält (Del Campo et al., 2007). Die getrocknete Biomasse wird hauptsächlich als Nahrungsergänzungsmittel in den USA eingesetzt (Bsp. Bioastin®). Die erste Anwendung von Ax als Pharmakon ist das gegenwärtig entwickelte Produkt Cardax, ein wasserdispergierbares Ax-Derivat (Dinatrium-Astaxanthin-Disuccinat). Cardax befindet sich in der klinischen Testung und hat kardioprotektive Wirkungen auf Hunde und einen herzmuskelschützenden Effekt nach Herzinfarkten in Ratten gezeigt (Gross und Lockwood, 2005, Gross et al., 2006). Nach seiner Zulassung soll es als antiinflammatorischer Wirkstoff eingesetzt werden.

Abgesehen von *H. pluvialis* wird noch eine weitere Mikroalge zur Carotinoidgewinnung kommerziell produziert: die halotolerante Grünalge *Dunaliella salina*. Sie akkumuliert β -Carotin bis zu 14% ihrer Trockenmasse und wird von verschiedenen Firmen z.B. Cognis Ltd., Australien und Cyanotech Corp., Hawaii in offenen Becken produziert (Borowitzka und Borowitzka, 1989, Ben-Amotz, 1995, Ben-Amotz, 2004, Hejazi et al., 2004, Borowitzka, 2005).

1.2.7 Carotinoidanalytik

Die Analytik und Identifizierung der Carotinoide in Algen stellt die Basis für die Untersuchungen ihrer Biosynthese bzw. für die Quantifizierung ihrer Zusammensetzung in den verschiedenen Gattungen dar. Die charakteristischste Eigenschaft der Carotinoide, ihr konjugiertes Doppelbindungssystem, macht sie für den Menschen im μg -Bereich sichtbar, daher lässt sich ihre Isolierung, Aufreinigung oder chemische Umsetzung leicht überwachen (Schiedt und Liaaen-Jensen, 1995). Die fehlerfreie Analytik der Carotinoide ist vergleichsweise schwierig, da sie labil gegenüber Licht, Wärme, Sauerstoff, Peroxiden, Säuren, Basen und aktive Oberflächen wie z.B. Aluminium sind. Eine derartige Exposition sollte verhindert werden, um eine Artefaktbildung (Isomere, Epoxide und Apocarotinoide) zu vermeiden (Oliver und Palou, 2000, Rodriguez-Amaya, 2001).

1.2.7.1 Spektrophotometrische Analyse von Carotinoiden

Das Absorptionsmaximum der Carotinoide im sichtbaren Bereich des Lichtes kann ein Unterscheidungskriterium zwischen Carotinoiden mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen sein. Eine Carbonylgruppe, die zum Doppelbindungssystem des Carotinoidgrundgerüsts konjugiert ist, verlängert dieses und verursacht eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums (in den Bereich höherer Wellenlängen). Zudem geht die dreigipflige Feinstruktur der Absorptionskurve verloren, es ist nur noch ein Absorptionsmaximum messbar.

Eine Carbonylgruppe, die nicht konjugiert ist, sowie Hydroxy- und Methoxygruppen haben keinen Effekt auf das Absorptionsmaximum (z.B. 4-Keto-Lutein). Eine *Z*-Isomerisierung einer Doppelbindung im Chromophor verursacht eine Abnahme der Absorptionsintensität, eine hypsochrome Verschiebung (zu kleineren Wellenlängen) sowie das Auftreten eines „*Z*-Peaks“ im nahen UV-Bereich. Dieses zusätzliche Absorptionsmaximum entsteht, weil die Konfiguration der konjugierten Doppelbindung die Verteilung der Absorptionsintensität sehr stark beeinflusst. Es können neue Elektronenübergänge beobachtet werden, die die Absorption im langwelligen UV-Bereich auslösen. Die Ausbildung des *Z*-Peaks schwächt die Absorption des all-*E*-Peaks ab, Lösungen von Carotinoidisomeren erscheinen daher deutlich weniger gefärbt als Lösungen des *E*-Konfigurationsisomers. Die Intensität des *Z*-Peaks ist von der Lage der (*Z*)-Doppelbindung abhängig und wird umso größer, je zentraler die (*Z*)-Doppelbindung liegt (Bsp. *Z*-Peak des 15-*Z*-Isomers ist am stärksten ausgeprägt) (Zechmeister, 1962).

Ein Problem in der Analytik der Carotinoide stellt das Vorhandensein von Chlorophyll in grünen Zellen dar. Die Absorptionsbanden im UV sowie im sichtbaren Bereich des Lichtes überlagern sich, und daraus resultiert eine zu hohe bzw. zu niedrige Konzentration an Chlorophyllen und Carotinoiden. Eine typische Methode, die Chlorophylle zu entfernen, ist die alkalische Hydrolyse (Verseifen), dies führt, v.a. unter aeroben Bedingungen, jedoch schnell zu Veränderungen an baselabilen Carotinoiden wie z.B. Ax (Yuan und Chen, 1999).

1.2.7.2 Chromatographische Methoden

HPLC-Methoden für die Trennung von Pflanzenpigmenten wurden bereits in den späten 70er bzw. den frühen 80er Jahren entwickelt (Schwartz und Von Elbe, 1982), später wurden immer komplexere Methoden zur Trennung, Identifizierung und simultanen Quantifizierung der Chlorophylle und Carotinoide speziell aus Algen publiziert (Mantoura und Llewellyn, 1983, Wright und Shearer, 1984, Vidussi et al., 1996, Lacker et al., 1999, Yuan et al., 2002). Wenn RP18-Materialien verwendet werden, kommen end-capped Phasen zur Anwendung, da auf diese Art polare Wechselwirkungen mit den Silanolresten verhindert werden, ein Tailing vermieden und die Reproduzierbarkeit verbessert wird. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass Normalphasensysteme eine geringere Selektivität für Carotinoide aufweisen als Umkehrphasensysteme (Garrido und Zapata, 1993). Die RP18-Phase wurde Mitte der 80er Jahre zur RP30-Phase weiterentwickelt, die für die strukturell sehr ähnlichen Carotinoide eine wesentlich höhere Selektivität aufweist (Dachtler, 2000). Diese wird jedoch bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen eingesetzt (Lacker et al., 1999, Böhm, 2000, Breithaupt et al., 2002).

1.2.7.3 Chiralitätsbestimmung von Astaxanthin

Über 400 der natürlich vorkommenden Carotinoide sind chiral mit einem oder mehreren Chiralitätszentren (Bsp. Neoxanthin: 5 chirale Zentren) (Britton et al., 1995a). Dies trifft auch für das Ax zu, welches zwei stereogene Zentren aufweist (vgl. Abbildung 4, S.9). Die Analytik der optischen Ax-Isomere erfolgte bislang über drei Wege. Erstens: die Identifizierung über leicht abweichende Absorptionsmaxima in der Vis-Spektroskopie (Yuan und Chen, 1997, Osterlie et al., 1999). Zweitens: die Überführung der Enantiomere mittels Camphansäurechlorid in die diastereomere Ester, die dann an Normalphasen getrennt werden können (Vecchi und Müller, 1979, Lura und Sægrov, 1991, Liaaen-Jensen und Egeland, 1999, Coral-Hinostroza und Bjerkeng, 2002). Die dritte Methode ist die chirale Trennung der Carotinoide mittels HPLC. Hierfür existieren einige wenige publizierte Methoden für die Ax-Trennung jeweils im RP-Modus: an einer L-Leucin-Phase (Turujman et al., 1997) und an einer D-Phenylglycin-Phase (Abu-Lafi und Turujman, 1999). Eine weitere Methode wurde von Matsuno et al. (1984) publiziert. Die beschriebenen Methoden wurden bislang entweder für die Bestimmung der Ax-Enantiomere in Lachs (Unterscheidung zwischen Wild- und Farmlachs) oder im synthetischen Produkt eingesetzt. Die Bestätigung der Ax-Konfiguration in *H. pluvialis* (3*S*,3'*S*) und in *Xanthophyllmyces dendrorhous* (3*R*,3'*R*) wurde mittels chiraler HPLC noch nicht publiziert. Weitere Methoden für die Charakterisierung der auftretenden Enantiomere sind die Röntgenkristallanalyse und der zirkuläre Dichroismus (CD).

1.3 LC-MS-Kopplung

LC-MS-Methoden, welche die leistungsstarke analytische HPLC-Trenntechnik mit der sehr empfindlichen MS-Detektion verbinden, werden in der Carotinoidanalytik ebenfalls nicht standardmäßig eingesetzt. Gerade für die Identifizierung der strukturell ähnlichen Carotinoide, die in der HPLC häufig koeluieren, ist die Massenspektrometrie eine wichtige analytische Methode. Darüber hinaus können auf diese Weise Verbindungen wie die strukturell diversen Carotinoidester identifiziert werden, von denen die Mehrzahl nicht als Referenzsubstanzen verfügbar ist. Eine der ersten Methoden, die sich der Identifizierung der Carotinoidester widmete, identifizierte u.a. Cryptoxanthin- und Luteinester in Fruchtsaft mittels MALDI-MS (Wingerath et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine LC-(APCI)-MS-Methode für die Identifizierung der Carotinoidester in *H. pluvialis* eingesetzt (Grewe et al., 2003). Gegenwärtig existieren nur wenige weitere Arbeiten (Breithaupt, 2004, Miao et al., 2006, Qin et al., 2008), die ebenfalls die Ax-Ester aus *H. pluvialis* mittels LC-MS untersucht haben. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Carotinoidester zunächst isoliert, in

Fettsäuremethylester überführt und anschließend mittels GC analysiert (Renstrom und Liaen-Jensen, 1981).

1.4 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Ax-Biosynthese in Grünalgen, im Besonderen mit Spezies, die potenziell für eine nachhaltige biotechnologische Produktion dieses Sekundärcarotinoides geeignet sind. Gegenwärtig wird Ax zu über 82% als Stereoisomerengemisch aus der Chemosynthese gewonnen (BBC Inc., 2004), die Kultivierung der einzigen viel versprechenden Grünalge, *Haematococcus pluvialis*, ist mit einer Reihe von Nachteilen behaftet (Del Campo et al., 2007).

Einen wichtigen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellte daher die Untersuchung der SC-Zusammensetzung und -Gehalte in phylogenetisch verwandten, bislang wenig beschriebenen Gattung *Scenedesmus* sp. dar. Diese Gattung wurde ausgewählt, da sie in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe die Fähigkeit gezeigt hatte, Ax zu synthetisieren. Sowohl die Wachstums- und SC-Bildungscharakteristik, als auch die morphologischen Veränderungen einer ausgewählten Spezies während der Stressexposition, die zur Induktion der SC-Biosynthese nötig ist, sollte mit der von *H. pluvialis* verglichen werden.

Der Optimierung der chromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Detektion zur Identifizierung des Ax, weiterer Carotinoide und der Strukturaufklärung ihrer Fettsäurederivate kam dabei eine hohe Bedeutung zu. Die Analytik der optischen Isomere sollte für die direkte Bestimmung der Ax-Konfiguration, welches aus verschiedenen mikrobiellen Quellen isoliert wurde, eingesetzt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es Aussagen zu treffen, inwiefern sich die SC-Zusammensetzung durch verschiedene Kultivierungsbedingungen verändert, sich diese gezielt in Richtung Ax beeinflussen lässt und ob diese zur Optimierung der Ausbeuten in einer selektierten *Scenedesmus*-Spezies beitragen können. Diese Untersuchungen sollen die Grundlage für die biotechnologische Gewinnung von 3S,3'S-Astaxanthin aus *Scenedesmus* sp. legen.

Da die Regulation der SC-Biosynthese nach Erkenntnissen aus *H. pluvialis* transkriptionell erfolgt (Steinbrenner und Linden, 2001) und aus *Scenedesmus* keine SC-Biosynthese-Gene bekannt sind, sollte in ersten Ansätzen die Carotinoid-Biosynthese-Gene einer *Scenedesmus*-Spezies charakterisiert und ihre stressbedingten Expressionsveränderungen beschrieben werden. Schwerpunkt dieser Arbeiten war es, ein SC-Biosynthese-Gen aus der Gattung *Scenedesmus* zu klonieren und damit Erkenntnisse über die Ax-Biosynthese zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Haematococcus pluvialis NIES 144 wurde aus dem National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Japan erhalten. Folgende Mikroalgen wurden aus der Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) bezogen: *Muriella zofingiensis* SAG 211/14, *Botryococcus braunii* SAG 30.81, *Protosiphon botryoides* SAG 28.91, *Desmodesmus armatus* SAG 276-4d, *Desmodesmus communis* SAG 276-4b, *Desmodesmus costato granulatus* SAG 18.81, *Desmodesmus denticulatus* SAG 19.81, *Desmodesmus subspicatus* SAG 54.80, *Scenedesmus acuminatus* SAG 38.81, *Scenedesmus costatus* SAG 32.88, *Scenedesmus falcatus* SAG 2.81, *Scenedesmus obliquus* SAG 276-12, *Scenedesmus producto capitatus* SAG 21.81, *Scenedesmus rubescens* SAG 5.95, *Scenedesmus vacuolatus* SAG 211-8e, *Coelastrella striolata* SAG 16.95, *Tetrademus wisconsinensis* SAG 3.99. Die Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* wurde von der DSMZ erhalten. Für die Klonierung des SC-Biosynthese-Gens wurden kompetente Bakterien vom Stamm *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) zur Transformation verwendet.

2.2 Chemikalien

Tabelle 4 : verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Referenzsubstanzen	
rac. Astaxanthin, Canthaxanthin	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
Lutein, Zeaxanthin, β -Carotin	Carl Roth, Karlsruhe
3S,3'S-Ax, Echinenon, Violaxanthin, Neoxanthin, Adonixanthin, Adonirubin	CaroteNature, Lupsingen, Schweiz
Lösungsmittel	
Ethylacetat, Mehtanol, Aceton, Acetonitril	VWR International, Darmstadt
Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol, Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser	Diagonal GmbH & Co.KG, Münster-Roxel
Medien/ Salze für die Mikrobiologie	
Glucose, Kartoffel-Glucose-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt	VWR International
Salze	
MgSO ₄ , KCl, MgCl ₂ , KNO ₃ , KH ₂ PO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , TrisHCl, NaCl	VWR International
EDTA (Dinatrium-Salz), Natriumacetat, Natriumcitrat, GAP, Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München
Vitamin B12, B1, B6	Sigma-Aldrich, München
Instant Ocean®	Weber Aquaristik, Sinzig

2.3 Medien

Die Mikroorganismen wurden zunächst auf den für sie laut Stammsammlung vorgesehenen Medien kultiviert, zur Stammhaltung erfolgte die Zugabe von 1,5% Agar (Carl Roth).

Tabelle 5 : verwendete Mikroorganismen und Kulturmedien (Zusammensetzung s. Anhang B)

Mikroorganismus	Medium
<i>Scenedesmus</i> sp., <i>Muriella zofingiensis</i>	Setlik (Setlik, 1968)
<i>H. pluvialis</i>	MiEB ₁₂ , BBM (Dominguez-Bocanegra et al., 2004), OHM (Fabregas et al., 2000), PET
<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Tetradesmus wisconsinensis</i> , <i>Protosiphon botryoides</i> , <i>Coelastrella striolata</i>	ES (SAG Göttingen)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Kartoffel-Glucose-Agar (KGA)
<i>E. coli</i>	SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% L Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 950 mL aqua dest., 10 mM MgCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose) LB-Medium: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl

Für die Induktion der SC-Biosynthese in den Mikroalgen wurde aus den in Tabelle 6 aufgeführten Medien die Nitrat- und Phosphatquellen entfernt, bzw. NaCl zugesetzt.

Tabelle 6 : verwendete Stressmedien für *H. pluvialis* und *S. rubescens*

	Stressmedium	Stressfaktor
<i>H. pluvialis</i>	PET OHM BBM	N, P-Mangel N, P-Mangel N, P-Mangel
<i>S. rubescens</i>	Setlik-Stress (SS) Instant Ocean® aqua dest. Leitungswasser	N, P-Mangel, 69 mM NaCl N, P-Mangel, 569 mM NaCl entionisiert 19°dH, 660 µS/ cm (20°C), TOC 1,8 mg/ L

2.4 Kultivierung

Alle Medien und Kultivierungsgefäße wurden vor der Verwendung bei 121°C 20 min autoklaviert. Vitamine und andere thermolabile Substanzen wurden steril filtriert (0,2 µm). Die Kultivierung der Stammkulturen der Mikroalgen erfolgte auf Schrägagarröhrchen bei kontinuierlicher Beleuchtung ($I = 25 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 18°C) und wurde alle 6 Wochen steril überimpft. In der nächsten Stufe der Kultivierung wurden diese Kulturen in Erlenmeyerkolben (250 mL) mit dem entsprechenden Flüssigmedium überführt und bei 25°C, kontinuierlicher Beleuchtung ($I = 50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und 110 rpm kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte in 2L-Doppelmantel-Glaszylindern (h = 70, d = 8 cm) bei 25°C und steriler Belüftung mit CO₂/Luft-Gemisch (2% v/v) bei einer Begasungsrate von 3,3 vvm. Die Grünalgen wurden in kon-

tinuierlichen Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, indem sie alle 7 Tage 1:10 (v/v) mit frischem Medium verdünnt wurden. Die Beleuchtungsintensität lag bei $I = 70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 6 OSRAM Leuchtstoffröhren a 36 W (Lichtfarbe Warm White) dienten als Lichtquelle. Die Lichtintensität wurde mit einem Lichtmessgerät (LI-250) der Firma LiCOR (Lincolns, USA) gemessen, zur Induktion der SC-Biosynthese betrug diese entweder 110 oder $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Algenzellen wurden abzentrifugiert (Sigma 3K12, 5000g) und für die Stressexposition mit einer Zellzahl von $1\cdot 10^6$ Z/ mL in einem nitrat- und phosphatfreien Medium resuspendiert. Die Kultivierung unter Stressbedingungen erfolgte in 100 mL Glaszylindern ($h = 25$, $d = 3$ cm) bei kontinuierlicher Bestrahlung (24h) bei 25°C und steriler Belüftung mit CO_2 / Luft-Gemisch (2% v/v) bei einer Begasungsrate von 3,3 vvm. Für die Untersuchungen über die Veränderungen der Pigmentzusammensetzungen in *S. rubescens* und *H. pluvialis* während der Stressexposition wurden aufgrund der hohen Probenahmefrequenz 2 L Blasensäulenreaktoren eingesetzt.

Versuche zur Erhöhung der Carotinoideausbeute

1. Variation der Lichtintensität

Diese Versuche wurden unter Ausschluss von Seiten- oder Deckenlicht in einer abgeschlossenen, für diese Arbeit konzipierten Anlage durchgeführt. Die Beleuchtung der 100 mL Glaszylinder ($d = 3$ cm) erfolgte von 2 Seiten mit jeweils 3 Leuchtstoffröhren (36 W, Lichtfarbe Warm White). Die verschiedenen Lichtintensitäten wurden durch den stufenlos verstellbaren Abstand der Seitenwände reguliert, die Lichtintensität über die begaste Höhe der Reaktoroberfläche gemittelt (6 Messpunkte a drei Messungen) und auf folgende Werte eingestellt: 110, 150, 250, 350, 625, 700, 875, 1050, 1125, 1400 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (beidseitig). Die Temperierung erfolgte über ein Wasserbad.

2. Variation der Lichtfarbe

Diese Versuche wurden ebenfalls unter Ausschluss von Störlicht unter einer Edelstahlhaube in 2 L Blasensäulenreaktoren durchgeführt. Von den 6 OSRAM Leuchtstoffröhren (36 W, Lichtfarbe Warm White) wurden jeweils 2 (die erste und die vierte von unten) durch Leuchtstoffröhren mit den Lichtfarben Blau ($\lambda_{\text{max}} = 470$ nm) bzw. UV ($\lambda_{\text{max}} = 370$ nm) ersetzt. Die Temperierung erfolgte mittels Wasserbad und Doppelmantelkühlung auf 25°C , die Lichtintensität der Weißlichtquelle betrug $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3. Variation der Salzkonzentration

Ausgehend vom Mineralmedium Setlik (Setlik, 1968) wurden folgende Variationen vorgenommen: Entfernung der Nitratquelle (S-N), Entfernung der Phosphatquelle (S-P), Entfer-

nung von Nitrat und Phosphat (S-N-P), Entfernung von Nitrat und Phosphat und Zugabe von 69 mM NaCl (S-N-P+ NaCl = Setlik Stress, SS), Zugabe von 19,4 mM KCl zu S-N-P und SS (isoosmotischer Ausgleich bezogen auf K). Für höhere Salzkonzentrationen wurde ein künstliches Meersalzmedium (Instant Ocean®, 569 mM NaCl) eingesetzt, welches kein Nitrat und Phosphat enthält.

4. Zugabe von Biosynthesevorstufen

Um einzuschätzen, ob die Kultivierung mit verschiedenen Biosynthese-Vorstufen des Isoprens einen positiven Einfluss auf die Ax-Biosynthese hat, wurden Pyruvat, GAP und Acetat in Konzentrationen von 6 bis 45 mM in das o.g. SS-Medium gegeben, und die Mikroalgen wurden unter den Standard-Induktionsbedingungen kultiviert.

Während der Kultivierungen erfolgte eine Kontrolle der Kulturen auf Kontaminationen mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX41). Die Bilddokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera (Olympus Camedia C5050).

2.5 Ernte und Trocknung

Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Algenkulturen 5 min abzentrifugiert (5000* g), 2mal mit aqua dest. gewaschen und die feuchte Biomasse anschließend lyophilisiert (P5, Piatkowski, p = 0,3 mbar, T = -80°C). Die Bestimmung der Restfeuchte der Biomasse erfolgte mit einer Trocknungswaage (MA 30, Sartorius, Göttingen).

2.6 Probenvorbereitung

2.6.1 Zellaufschluss und Extraktion

20 bis 50 mg lyophilisierte Biomasse wurde mit Seesand versetzt (50:50 v/v), mit einem Glasstab vermischt und mit 10-15 Tropfen Aceton befeuchtet. Anschließend wurde die Biomasse in einer Schwingkugelmühle (MM 200, Retsch GmbH, Haan) bei einer Frequenz von 30 s⁻¹ 20 min aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde in 5 mL-Schritten mit Aceton extrahiert, bis der Biomasserest farblos war. Die Einengung der gesammelten Extrakte bis zur Trockene erfolgte mittels Rotationsvakuumverdampfer (Heidolph, Kelheim).

Für die RNA-Isolierung wurde die gefrorene Biomasse (-80°C) mit Seesand und flüssigem Stickstoff vermörsert und anschließend in einem Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) mit fünf Zyklen a 16'' aufgeschlossen. Zwischen jedem Zyklus wurden die Proben in flüssigem Stickstoff zwischengekühlt, um ein Auftauen zu verhindern.

2.6.2 Isomerisierung des Ax-Standards

Ein halbes mg eines reinen all-*E*-Ax-Standards wurde in 1 mL Acetonitril gelöst und die Carotinoid-Standardlösung mit verschiedenen Verfahren isomerisiert: 1h unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$), 1h unter $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht, 1h unter Rückfluss in Acetonitril gekocht (80°C) (Zechmeister, 1962).

2.7 Analytik

Aufgrund der licht- und temperaturempfindlichen Carotinoide wurden alle Analysenschritte unter Schwachlicht ($< 15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und auf Eis durchgeführt. Lösungsmittel wurden schnellstmöglich entfernt und eine Lagerung der trockenen Extrakte und Referenzsubstanzen erfolgte unter Stickstoff bei -80°C .

2.7.1 Biomassebestimmung

Das Wachstum der Mikroalgen in Flüssigkultur wurde mittels Zellzahlmessgerät (Multisizer 3, Coulter Counter, Beckman Coulter, Krefeld) und mittels gravimetrischer Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration bestimmt. Hierfür wurden 10 mL Algenkultur in vorgewogenen Röhren zentrifugiert, 2mal mit aqua dest. gewaschen und 24h bei 105°C getrocknet.

2.7.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die Extrakte wurden in 10 bis 50 mL Maßkolben in Aceton gelöst und photometrisch (Specord 40, Analytik Jena) bei folgenden Wellenlängen gemessen: 450 nm, 645 nm, 663 nm und 750 nm. Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte erfolgte nach Jeffrey und Humphrey (1975) nach folgenden Gleichungen (c in mg/L):

$$c_{\text{Chl.a}} = 12,3 \cdot E_{663} - 0,86 \cdot E_{645} \quad \text{Gln. 1}$$

$$c_{\text{Chl.b}} = 10,3 \cdot E_{645} - 3,6 \cdot E_{663} \quad \text{Gln. 2}$$

2.7.3 DC

Die Carotinoidextrakte wurden auf aktivierten Kieselgelplatten (1h, 110°C) vorgetrennt (KG 60 F254, 0,2 mm, VWR International), mit einem Laufmittel von n-Hexan/ Aceton/ 2-Propanol 80/20/5 (v/v/v) entwickelt und luftgetrocknet. Die DC-Kammern wurden in Alufolie eingewickelt. Die Analyse einzelner Verbindungen (z.B. chirale Trennung) erfolgte nach Elution der entsprechenden Banden mit Ethylacetat.

2.7.4 HPLC

Die Analysen wurden mit einer Hitachi HPLC-Anlage, bestehend aus einem L-7612 Degaser, einer L-6200 Pumpe (Niederdruckgradient), einem L-4500 Diodenarraydetektor, einem L-4000 Integrator und einem AS-4000 Autosampler mit einer 20 µL Probenschleife durchgeführt. Die Säulentemperierung erfolgte in einem Jetstream Säulenofen.

Die Extrakte wurden in 200-1000 µL Aceton aufgenommen, durch 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und 20 µL in eine HP 1000 HPLC-Anlage injiziert. Die Ermittlung der Kapazitätsfaktoren erfolgte mit Thioharnstoff ($c = 1 \text{ mg/ mL}$).

RP-HPLC

Säule: RP30, 250*4 mm, 100 Å (Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen), Vorsäule: RP30, 10*4 mm; Temperatur: 25°C, Detektion: 470 nm; Mobile Phase: Fluss: 0,6 mL/ min, Gradientenelution (A: MeOH/ H₂O (75/25 v/v), B: EtOAc) in 25 min von 70% auf 45% A, in weiteren 25 min auf 10% A, 10 min linear und 10 min zurück auf 70% A

Für die Trennung der Ax-Ester der *H. pluvialis*-Extrakte wurde der Gradient so verändert, dass die 90% EtOAc erst nach 90 Minuten erreicht wurden. Die Quantifizierung der Carotinoide erfolgte durch Kalibrierung mittels externem Standard als 7-Punkt-Kalibrierung (Korrelationskoeffizienten s. Anhang E).

Trennung der geometrischen Isomere

Zur HPLC-Trennung der entstandenen Z-Isomere wurde als mobile Phase ein Gemisch von Aceton/ Wasser 78:22 (v/v) bei einer Flussrate von 0,6 mL/ min und einer Temperatur von 25°C verwendet sowie sowohl eine RP18 Säule (LiChrosphere, Merck, 250*4,6 mm, 5µm) als auch eine RP30 Phase (Alltech Grom, 250*4 mm, 5 µm). Die Detektion erfolgte bei 470 nm. Die Q-Werte der geometrischen Isomere wurden nach folgender Gleichung ermittelt:

$$Q = \frac{\text{AbsorptionHauptpeak}}{\text{AbsorptionZPeak}} \quad \text{Gln. 3}$$

Chirale HPLC

Folgende HPLC-Säulen wurden für die chirale Trennung der Ax-Stereoisomere getestet: drei Chiragrom-Säulen (Typ 1, 2 und 10; Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen), vier Chiralcel-Säulen (Typ AD, OB, OC und OD-RH; Daicel, Tokyo, Japan), zwei Pirkle-Phasen (Typ *R,R* Ulmo and *L*-Leucin; Regis Technology, Morton Grove, Illinois, USA) und eine Chiradex-Säule (Merck, Darmstadt). Die Chromatogramme wurden bei 470 nm aufgenommen. Die Trennung erfolgte an einer Chiralcel OD-RH-Säule (5 µm, 150 mm*4.6 mm) der Fa.

Daicel (Eschborn) mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril/ 3.5 mM H₃PO₄ und einem Fluss von 0,5 mL/ min (T = 25 °C).

2.7.5 MS und LC-MS

Für die MS-Analysen wurde ein Bruker Esquire 3000 Massenspektrometer (Ionenfalle) mit ESI-(Elektronenspray-Ionisation)- und APCI-(Atmosphärische Chemische Ionisation)-Quelle verwendet. Die Optimierung der MS-Bedingungen erfolgte mit dem Ziel maximaler Ionenausbeuten optimiert und folgende Parameter ermittelt: APCI Temperatur 270°C, Nebulizer 20 psi, Trocknungsgas-Temperatur (Stickstoff) 300°C; Trocknungsgas-Flussrate 5 L/ min; Corona-Spannung 4 kV. Die Detektion erfolgte im Massenbereich von 50 bis 2000 m/z im positiven APCI-Modus. Helium wurde als Stoßgas zur Strukturaufklärung eingesetzt. Die LC-MS-Analysen erfolgten an einer HP 1100 Chromatographieanlage (Hewlett-Packard, Waldbronn), der Trocknungsgas-Fluss am Massenspektrometer wurde auf 8 L/ min und der Nebulizerdruck auf 40 psi erhöht.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Tabelle 7 : Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
RNA-Extraktionspuffer	8 M Guanidiniumchlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA (pH = 7,0)
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA
10 x MEN	200 mM MOPS-Puffer, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, (pH = 7,0)
DNA-Stoppuffer	50% (v/v) Glycerin, 120 mM EDTA pH 8,0, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1% Bromphenolblau
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat (pH = 7,0)
X-Gal-Lösung	100 mg/ mL Dimethylformamid
H ₂ O _{DEPC}	0,1% Diethylpyrocarbonat in bidest. H ₂ O
Hybridisierungslösung für Northern	0,25 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 7% (m/V) SDS, 1% (m/V) BSA
10 x MOPS-Puffer	200 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH = 7,0)
WB-Puffer/ WB-T	20 mM Tris-Acetat, pH = 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 300 mM Kaliumglutamat, 10% Glycerol, 1 mM Dithiothreitol, 1% NP-40); WB-T + 0,05% Triton
BB-Puffer/ BB-T	10 mM HEPES, pH = 7,9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 12,5% Glycerol/ BB-T: BB + 0,05% Triton
TE-Puffer/ TE-T	10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 1 mM EDTA/ TE-T: TE + 0,05% Triton

Verwendete Primer

Für die Synthese der degenerierten Primer wurden konservierte (identische) Bereiche des *BKT*-Gens aus *H. pluvialis* und *M. zofingiensis* ausgewählt, die einen hohen Anteil an AS mit geringem Degeneriertheitsgrad aufwiesen. Nach erfolgreicher Amplifizierung des *BKT*-Fragmentes mittels touchdown-PCR wurden von der erhaltenen Sequenz genspezifische Primer (*BKT* test und GSP) abgeleitet, die für eine Standard-PCR eingesetzt wurden. Die *BKT*_n 1 und 2 GSP sind nested Primer und wurden für die 3' RACE-PCR entwickelt.

Tabelle 8 : verwendete Primer für PCR

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße (bp)
5' HpBKT_HWEHHTG_5 3' HpBKT_HWEHHRWP_3	CAC/T TGG GA/AG CAT/C CAT/C AAC/T CAT/C ACI GG GG CCA ICG/T G/ATG G/ATG T/CTC CCA G/ATG	396
BKT test 5 BKT test 3	GACAGCCCCATGAAGATCCAGAC ACTCAGCGCAGATGGCGCCATTG	305
GSP 5 GSP 3	GCCGACCTTGCCTTCGCCACGACATCAC CTGGGTCAGGCCTAGTGTCAGCAGTG	112
BKT_n1GSP_5	TCATCAGCACCCCTTCCTGGGCTTG	-
BKT_n2GSP_5	GTAGAACAGTCGCACTGCTGACAC	-
GIA RACE 1	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGG GGGGGGG	-

Grundsätzlich erfolgte der Ablauf der molekularbiologischen Arbeiten zur Klonierung des SC-Biosynthese-Gens von der PCR bis zur Sequenzierung nach folgendem Schema:

1. RNA-Isolierung
2. cDNA-Synthese
3. Amplifikation der DNA mittels RT-PCR
4. Auftrennung des PCR-Ansatzes mittels Gel-Elektrophorese
5. Reinigung des PCR-Produktes mit QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden)
6. Klonierung in pCR2.1TopoTA-Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe)
7. Selektion positiver Klone mittels Kolonie-PCR
8. Plasmidpräparation mit QIAprep Midiprep Kit (Qiagen)
9. Sequenzierung

2.8.1 RNA-Isolierung

Die mittels Precellys aufgeschlossene Biomasse wurde mit 1,5 Volumen RNA-Extraktionspuffer versetzt. Anschließend wurde 0,7 Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) zugegeben und gut durchmischt. Die Lösung wurde bei 12.000 rpm 10 min zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und ihr Volumen bestimmt. Nach Zugabe von 0,05

Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol refolgte die Inkubation der Lösung für 1 h bei -80°C . Die ausgefällte RNA wurde bei 12.000 rpm 10 min zentrifugiert und wie folgt gewaschen: einmal mit 70% EtOH (-20°C), zweimal mit 3 M Natriumacetat (pH = 4,8) und einmal mit 70% EtOH (-20°C). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 50-150 μL H_2O re-suspendiert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe einer Quarzküvette wurde die Nukleinsäurekonzentration der Lösung spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht dabei 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA. Das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 und 280 nm ($\text{OD}_{260/280}$) wurde zur Ermittlung der Reinheit der Nukleinsäurelösung berechnet. Bei reinen Nukleinsäurelösungen werden Werte zwischen 1,8 und 2,0 gemessen, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine, höhere Werte auf Polysaccharide hin.

2.8.3 PCR

Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 300 bis 1.000 bp angewendet. Je nach späterem Verwendungszweck wurde das Volumen des Reaktionsansatzes mit 20 μL (analytisch) oder 50 μL (präparativ) gewählt, die Zusammensetzung ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 9: Zusammensetzung PCR-Mix

	20 μL	50 μL
DNA	1	1
H_2O	14	36
10xTaq-Puffer	2	5
Nucleotide (2 mM)	2	5
Primer 1 (100 pmol/ μL)	0,5	1
Primer 2 (100 pmol/ μL)	0,5	1
Taq-Polymerase (5 U/ μL , Fermentas, St. Leon-Rot)	0,2	1

Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen für das PCR-Standardprogramm

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	2'	94°C	1
Denaturierung	10''	94°C	40
Annealing	30''	$\text{AT}^{\circ}\text{C}$	
Elongation	1'	72°C	
terminale Elongation	7'	72°C	1
Abkühlen	∞	4°C	1

Die Annealingtemperatur wurde 4-5°C unterhalb der Schmelztemperatur (T_m) der Primer gewählt, die sich wie folgt berechnet:

$$T_m = (69,3^\circ\text{C} + (0,41 * \%GC) - 650) / \text{Primerlänge} \quad \text{Gln. 4}$$

Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR, touchdown)

Die Synthese komplementärer einzelsträngiger cDNA aus der isolierten Algen-RNA wurde mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase durchgeführt. Hierfür wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit der Fa. Fermentas verwendet. Die cDNA-Synthese wurde nach Herstellerangaben sowohl mit Random Hexamer Primer als auch mit oligo(dT) Primer durchgeführt. Nach 1 h Inkubationszeit bei 42°C wurde das Enzym für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Für die anschließende PCR wurde das Reaktionsprodukt 1:5 verdünnt. Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die zuvor synthetisierte einzelsträngige cDNA zu amplifizieren. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet: 1 µL cDNA, 33 µL H₂O, 5 µL 10 x Taq-Puffer, 5 µL 2 mM dNTPs, 1 µL *sense* Primer (100 pmol/µL), 1 µL *antisense* Primer (100 pmol/µL) und 0,5 µL Taq Polymerase.

Tabelle 11: Amplifikationsbedingungen für die RT-touchdown-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	30''	94°C	1
Denaturierung	30''	94°C	15
Annealing	30''	55 → 40 ($\Delta t = 1^\circ\text{C}$)	
Elongation	30''	72°C	
Denaturierung	30''	94°C	20
Annealing	30''	40°C	
Elongation	30''	72°C	
terminale Elongation	7'	72°C	1
Abkühlen	∞	4°C	1

Kolonie-PCR

Die Kolonie PCR wurde eingesetzt um die Klone zu identifizieren, die nach erfolgter Transformation das gewünschte Plasmid enthielten. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden eine weiße Bakterienkolonie selektiert und anschließend direkt dem PCR-Mix zugefügt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und M13 uni/rev Primern eine PCR durchgeführt (s. Tabelle 11).

Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen für die Kolonie-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	2'	94°C	1
Denaturierung	15''	94°C	35
Annealing	30''	50°C	
Elongation	1'	72°C	
terminale Elongation	7'	72°C	1
Abkühlen	∞	4°C	1

5'-RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends)

Für die mRNA Isolierung wurden 50 μL oligo(dT)₂₅ Dynabeads (Invitrogen) wie folgt vorbereitet: einmal mit 100 μL BB-T und zweimal mit 100 μL BB-Puffer gewaschen (nach dem Waschen wurde das Reaktionsgefäß in einen Magneten gestellt, der die Beads an einer Wandung konzentriert, sodass die Flüssigkeit abgenommen werden kann). 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNA (verdünnt mit H₂O_{DEPC}) wurden 2 min bei 65°C inkubiert und danach 1 min auf Eis abgekühlt. 25 μL RNA wurden anschließend mit 25 μL Bead-Suspension gemischt. Das Annealing erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Roller, um die Sedimentation der Beads zu verhindern. Der Ansatz wurde im Anschluss zweimal mit 100 μL WB-T, dreimal mit 100 μL WB Puffer und einmal mit H₂O_{DEPC} gewaschen, die Überstände jeweils verworfen. Die Einstrang-cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des ThermoSkript RT-PCR Kits der Fa. Invitrogen. Die RNA-Beads wurden in 22 μL H₂O_{DEPC} aufgenommen, mit 4 μL 10 mM dNTPs für 5 min bei 65°C inkubiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese nach Herstellerangaben. Während der Synthese (Inkubation für 45 min bei 52°C) wurde der Ansatz alle 5 min von Hand gemischt, nach 45 min wurde erneut 0,5 μL RTase zugegeben und nochmals für 20 min bei 52°C inkubiert. Die Hitzeschock-Inaktivierung erfolgte für 5 min bei 85°C. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde 2 μL RNase H zugegeben. Die Inkubation der Reaktion erfolgte bei 37°C für 20 min. Der Ansatz wurde anschließend mit 100 μL TE-T Puffer und zweimal mit 100 μL TE Puffer gewaschen.

Die cDNA an den Dynabeads wurde mit Hilfe einer terminalen Desoxy-Transferase (TdTase, 20 u/ μL , Fermentas) am 3' Ende mit einem poly-C-Schwanz versehen. Hierfür wurden die Beads in 24 μL H₂O aufgenommen, mit 8 μL 5x TdT Puffer und 4 μL 2 mM dCTPs gemischt und bei 94°C für 3 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 4 μL TdTase zugegeben, und der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Hitze-Inaktivierung erfolgte bei 70°C für 10 min. Im Anschluss wurde der Ansatz jeweils zweimal mit 100 μL TE-T Puffer und 100 μL TE Puffer gewaschen. Die cDNA-beads mit oligo(dT)-Schwanz wurden in 40 μL TE Puffer resuspendiert, und 1 μL für die PCR (50 μL Ansatz) mit folgenden Primern verwendet: GIA RACE1 (10 μM) und BKT GSP_5 (1 μM). Diese erste PCR wurde mit zwei Temperaturprogrammen durchgeführt (touchdown).

Tabelle 13 : Temperaturprogramme der 5'-RACE-PCR

Schritt	(A)			(B)		
	Zeit	Temp.	Zyklenzahl	Zeit	Temp.	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	1'	94°C	1	1'	94°C	1
Denaturierung	10''	94°C	10	10''	94°C	10
Annealing	15''	60 → 55°C $\Delta t = 0,5^\circ\text{C}$		15''	55 → 50°C $\Delta t = 0,5^\circ\text{C}$	

Elongation	90''	72°C		90''	72°C	
Denaturierung	10''	94°C	30	10''	94°C	30
Annealing	15''	55°C		15''	55°C	
Elongation	90''	72°C		90''	72°C	
terminale Elongation	7'	72°C	1	7'	72°C	1

Für die 2. PCR wurde 1 µL DNA aus der ersten PCR (Temperatur A und B) verwendet (50 µL Ansatz). Diese 2. PCR (nested Prinzip) erfolgte mit zwei Primerkombinationen: nested Primer 1 (BKT n1 GSP_5) und dem GIA Race 2 Primer (je 10 µM) sowie mit dem nested Primer 2 (BKT n2 GSP_5). Die Annealingtemperatur wurde im „touchdown“ Prinzip im ersten Versuch von 58°C auf 53°C abgesenkt (40 Zyklen), im zweiten Versuch von 63°C auf 58°C.

2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes mit Stopppuffer gemischt, auf ein 1,5% (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (U = 80 V). Als Laufpuffer diente 1xTAE, der auch zum Lösen der Agarose verwendet wurde. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein λ-Pst-Marker eingesetzt (λ-DNA mit *PstI* gespalten, + DNA-Probenpuffer). Nach Beendigung der Trennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend unter UV-Beleuchtung analysiert.

2.8.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung des PCR-Produktes in einem Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande auf einem Transilluminator unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) mit Hilfe einer Mikrozentrifuge nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.6 Klonierung

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der pCR2.1TOPO, ein kommerziell erhältlicher, linearisierter Plasmidvektor mit T-Überhängen, sowie das TA cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet. Ein Ligationsansatz bestehend aus 3 µL PCR-Produkt, 1 µL Ligationspuffer, 2 µL Vektor (25 ng/ µL), 3 µL H₂O und 1 µL des Enzyms T4 DNA-Ligase wurde hergestellt und bei 14°C über Nacht inkubiert.

2.8.7 Transformation in kompetente Zellen

Die Plasmide wurden durch Transformation in kompetente *E. coli* Zellen (TOP10) eingebracht. Die Bakterien wurden aufgetaut und 50 µL Suspension wurden mit 3 µL Ligationansatz vermischt. Anschließend wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C erfolgte die Zugabe von 250 µL SOC-Medium und die Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37°C und 225 rpm. Auf Agarplatten (LB-Medium + 50 µg/ mL Kanamycin) wurde 40 µL X-Gal (40 mg/ mL) aufgespatelt und luftgetrocknet. Auf die so behandelten Agarplatten wurden je Ansatz einmal 50 und einmal 200 µL ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C mindestens für 18h, für eine verbesserte Farbentwicklung wurden die Agarplatten anschließend für 2-3 h bei 4°C gelagert. Nach Antibiotika- und blau/weiß-Selektion wurden resistente, weiße Kolonien auf eine Masterplatte überimpft bzw. in Flüssigmedium zur Amplifikation der Plasmide verwendet.

2.8.8 Plasmidpräparation

Ein Aliquot von 2 mL über-Nacht-Kulturen der positiven Klone wurden in 2 mL Eppis überführt und 1 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend die Plasmide mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

2.8.9 Restriktionsverdau

Die Plasmide wurden mit der Restriktions-Endonuklease *EcoRI* einer Restriktionsspaltung unterzogen. Der Restriktionsansatz bestand aus 16 µL H₂O, 2 µL *EcoRI* Puffer, 1 µL RNase und 2 µL DNA. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch getrennt.

2.8.10 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA wurde von der Firma MWG bzw. von Fr. Ulrike Smolka am IPB Halle sequenziert. Die Sequenzhomologierecherche wurde online mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt, Sequenzalignments mittels ClustAIW 2.0.5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Die Suche nach Intron/Exon Strukturen wurde mit dem Programm GENSCANW (<http://genes.edu/cgi-bin/genscanw.cgi>) durchgeführt. Zur Analyse der Proteinstruktur- und Funktionsanalysen wurden die Expasy-Proteomics-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) InterPro Scan und Predotar verwendet.

2.8.11 Northern-Blot

Die isolierte RNA wurde zunächst in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel in 1**MEN* Puffer bei 70 V für ca. 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt (Gelzusammensetzung: 1% Agarose (w/v), 10% 10**MEN* Puffer (v/v) in tridest. H₂O, nach dem Aufkochen und Abkühlen Zugabe von 18,5 mM Formaldehyd). Die Denaturierung der RNA-Proben erfolgte bei 65°C für 10 min (RNA-Probe, 4 µL Stopppuffer und 0,5 µL Ethidiumbromid). Das Gel wurde anschließend über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Transferpuffer 20 x SSC-Lösung). Als Sonde für die Expressionsanalysen kam der *BKT* H12 Klon aus *S. producto capitatus* zum Einsatz, die Plasmid-DNA wurde zunächst 1:100 verdünnt. Mit den Primern *BKT* test 5 und *BKT* test 3 wurde eine Standard-PCR mit einer Annealingtemperatur von 60°C und einer Zyklenzahl von 40 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde nach elektrophoretischer Trennung mittels Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und 5 µL der aufgereinigten DNA mit Hilfe des Amersham Megaprime Kits nach Herstellerangaben für die Herstellung der Sonde verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mit $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP. Der Ansatz bestand aus 5 µL DNA-Matrize (50-100 ng), 4 µL 2 mM dNTP-Mix (dCTP, dGTP, dTTP), 5 µL Primer, 5 µL Reaktionspuffer, 16 µL mit bidest. H₂O, 5 µL $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP und 2 µL Klenow-Polymerase (2U/ µL). Die Polymerase synthetisierte für 10 min bei 37°C radioaktiv markierte Komplementärstränge zur Matrizen-DNA. Nach dem Lauf über eine Reinigungssäule und 5 minütiger DNA-Denaturierung bei 95°C wurde die Sonde in die vorbereitete Hybridisierungsröhre gegeben (Vorhybridisierung der geblottete Membran 1 h bei 42°C im Hybridisierungspuffer). Die Hybridisierung der Membranen erfolgte dann für 16 h bei 42°C in einem Rotationsofen. Anschließend wurde die Membran dreimal mit ca. 40 mL 3 x SSC mit 0,1% SDS bei 65°C für 20 min gewaschen. Nach der Trocknung erfolgte die Identifizierung von Hybridisierungssignalen über einen Typhoon Phosphoimager.

2.9 Statistische Analyse

Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel berechnet. Als statistischer Signifikanztest zwischen Messreihen mit unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurde die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance, gewähltes Signifikanzniveau: 5%) gewählt. Anschließend wurden mit Hilfe des Tukey-Tests die erhaltenen Mittelwerte auf signifikante Unterschiede getestet (Programm: Statistica 7.0). Zeitlich nacheinander durchgeführte Kultivierungen unter gleichen Kultivierungsbedingungen wurden mittels t-Test und Lord-Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Für den Vergleich von Paardifferenzen kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Sekundärcarotinoide phylogenetisch verwandter Mikroalgen

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die SC-Bildung in verschiedenen, ausgewählten grünen Mikroalgen unter identischen, SC-Biosynthese-induzierenden Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden, basierend auf der 18S rRNA-Stammbaumanalyse (Kessler et al., 1997) in Kooperation mit Prof. Friedl (Universität Göttingen), phylogenetisch verwandte, in Stammsammlungen verfügbare, schnellwüchsige chlorococcale Chlorophyceen, der Gattung *Scenedesmus* und ihrer Untergattungen (*Scenedesmus* und *Desmodesmus*) ausgewählt. Nach Kultivierung der Spezies unter physiologischen Bedingungen wurden diese in ein Stressmedium ($\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ Mangel und 69 mM NaCl) überführt und erhöhter Lichtintensität ($110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ausgesetzt. Die Kulturfarbe während der Stressexposition von 14 Tagen unterschied sich in Abhängigkeit der untersuchten Spezies: einige Stämme zeigten eine deutlich orange Färbung, andere eine bräunliche Verfärbung, wohingegen sich einige Kulturen vollständig entfärbten. Dieses Phänomen traf v.a. auf die *Desmodesmus*-Spezies zu, die keine oder nur geringe Mengen an Carotinoiden synthetisierten. Drei von fünf untersuchten Stämmen (*Desmodesmus armatus*, *D. communis* und *D. costato-granulatus*) entfärbten sich vollständig unter den Stressbedingungen. Die gewählten Bedingungen waren jedoch für die Mehrzahl der untersuchten Mikroalgen (15 von 18 Stämmen) für die Induktion der Ax-Biosynthese ausreichend. Die Zusammensetzung und die Gehalte der sekundären Carotinoide nach Beendigung der Kultivierung sind in Abbildung 8, S.36 zusammengefasst, Abbildung 9, S. 37 stellt eine Auswahl der HPLC-Chromatogramme der Algenextrakte dar.

Die Ax-Biosynthese war in allen Mikroalgen mit der Akkumulation einer komplexen Mischung verschiedener Carotinoide verbunden. Sowohl der Ax-Gehalt als auch der Gesamtcarotinoidgehalt, der in den Mikroalgen nach 14-tägiger Stressexposition erzielt wurde, unterschied sich sowohl innerhalb einer Gattung als auch gattungsübergreifend deutlich voneinander. Der geringste Gesamtcarotinoidgehalt wurde in *S. falcatus* gemessen ($0,1 \pm 0,01 \text{ mg/ g TS}$) und lag damit 200mal niedriger als in *H. pluvialis*, der mit $20,22 \pm 0,17 \text{ mg/ g TS}$ sowohl den höchsten Carotinoidgehalt, als auch mit $17,78 \text{ mg/ g TS}$ den höchsten Ax-Gehalt aufwies. Neben *H. pluvialis* enthielten nur zwei weitere Spezies Carotinoidgehalte von mehr als 10 mg/ g der TS: *Tetradesmus wisconsinensis* ($17,85 \pm 0,19 \text{ mg/ g}$) und *M. zofingiensis* ($18,39 \pm 0,16 \text{ mg/ g}$). Diese charakteristischen Unterschiede in den Carotinoidgehalten wurden auch in phylogenetisch eng verwandten Arten wie *S. obliquus* und *S. rubescens* gefunden. *S. obliquus* wies mit $0,82 \pm 0,08 \text{ mg/ g TS}$ einen 5,5-fach geringeren Carotinoidgehalt auf als *S. rubescens*

(4,47±0,16 mg/ g TS). *S. producto capitatus* erzielte mit 5,37±0,11 mg Carotinoiden/ g TS die höchste Ausbeute an Carotinoiden in allen untersuchten *Scenedesmus*-Spezies.

Im Vergleich zu Mikroalgen anderer Gattungen wiesen alle untersuchten Spezies der Gattung *Scenedesmus* einen geringeren Gesamtcarotinoidgehalt auf. *S. rubescens* und *S. producto capitatus* erzielten die höchsten Ausbeuten an Carotinoiden in der Gattung *Scenedesmus*. *S. rubescens* enthielt Ax, Adonixanthin und β -Carotin in den höchsten Gehalten im Vergleich zu allen anderen *Scenedesmus*-Spezies.

Das Spektrum der gebildeten Carotinoide und ihrer Carotinoidester unterschied sich hauptsächlich quantitativ. Es wurden v.a. Ax, Adonixanthin, Lutein, Adonirubin und Cx detektiert. Der Ax-ME-Anteil betrug durchschnittlich 86,7±5,4% der ME-Fraktion. Neben Ax-Fettsäureestern wurden darüber hinaus Adonirubin-, Adonixanthin- und Luteinmonoester nachgewiesen. In der DE-Fraktion wurden ausschließlich Ax-Ester detektiert.

Unverestertes Ax konnte in zwölf der 15 Stämme nachgewiesen werden, nur in *T. wisconsinensis*, *Protosiphon botryoides* und *S. falcatus* lag der Ax-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. Durchschnittlich betrug der Gehalt an freiem Ax in den analysierten Grünalgen 0,13 mg/ g TS, was minimal 0,2% des Carotinoideanteils in *H. pluvialis* und maximal 12,2% des Carotinoideanteils in *S. obliquus* entsprach. In *S. rubescens* lag der Ax-Gehalt jedoch mit 0,36±0,03 mg/ g TS selbst im Vergleich zu Mikroalgen mit wesentlich höheren Gesamtcarotinoidgehalten relativ hoch (0,45±0,02 mg/ g TS in *M. zofingiensis* und 0,35±0,05 mg/ g TS in *Coelastrella striolata*). Der Anteil an Ax (Summe aus freiem und verestertem Ax) am Gesamtcarotinoidgehalt der Stämme variierte zwischen 10,5% (*S. acuminiatus*) und 87,9% (*H. pluvialis*), vgl. Abbildung 8. Während *H. pluvialis* hauptsächlich Ax-Monoester akkumulierte (13,17±0,1 mg/ g TS), wurden in *M. zofingiensis* die höchsten Gehalte an Ax-DE gefunden (3,71±0,1 mg/ g TS).

Der Anteil der Ax-Ester am Ax-Gehalt betrug in *S. rubescens* 20,6% (Ax-Gehalt 1,24±0,13 mg/ g TS), während in *H. pluvialis* hingegen Ax zu 96% verestert vorlag (vgl. Tabelle 14, S. 11).

In *S. producto capitatus*, *Botryococcus braunii* und *T. wisconsinensis* enthielten mit 57,7%, 57,8% bzw. 49,1% des Gesamtcarotinoidgehaltes hohen Gehalte an Cx. In *Tetradesmus wisconsinensis* überstieg der Cx-Gehalt mit 8,77±0,18 mg/ g TS den Gesamtcarotinoidgehalt von zwölf der analysierten 15 Mikroalgen. Cx stellte auch in sechs weiteren Stämmen das Carotinoide mit dem höchsten Anteil der SC dar.

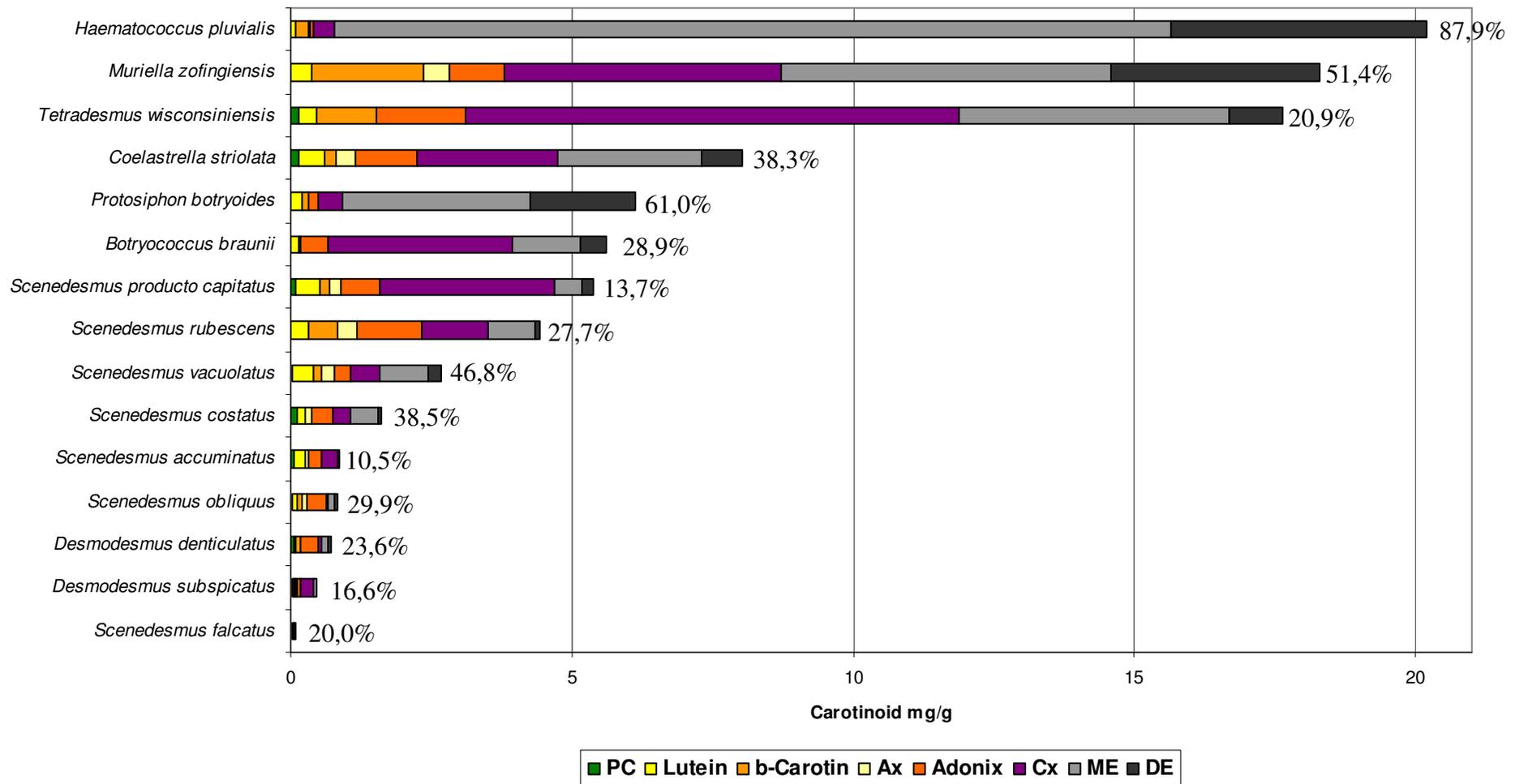


Abbildung 8: Carotinoidzusammensetzungen und –gehalte (mg/ g TS) in den untersuchten Mikroalgen nach 14-tägiger Kultivierung, Prozentangabe entspricht dem Ax-Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt (Anteil ergibt sich aus der Summe aus freiem Ax, Ax-Mono- und Ax-Diestern), Bedingungen: SS-Medium, $V_R = 100 \text{ mL}$, $I = 110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n = 6$

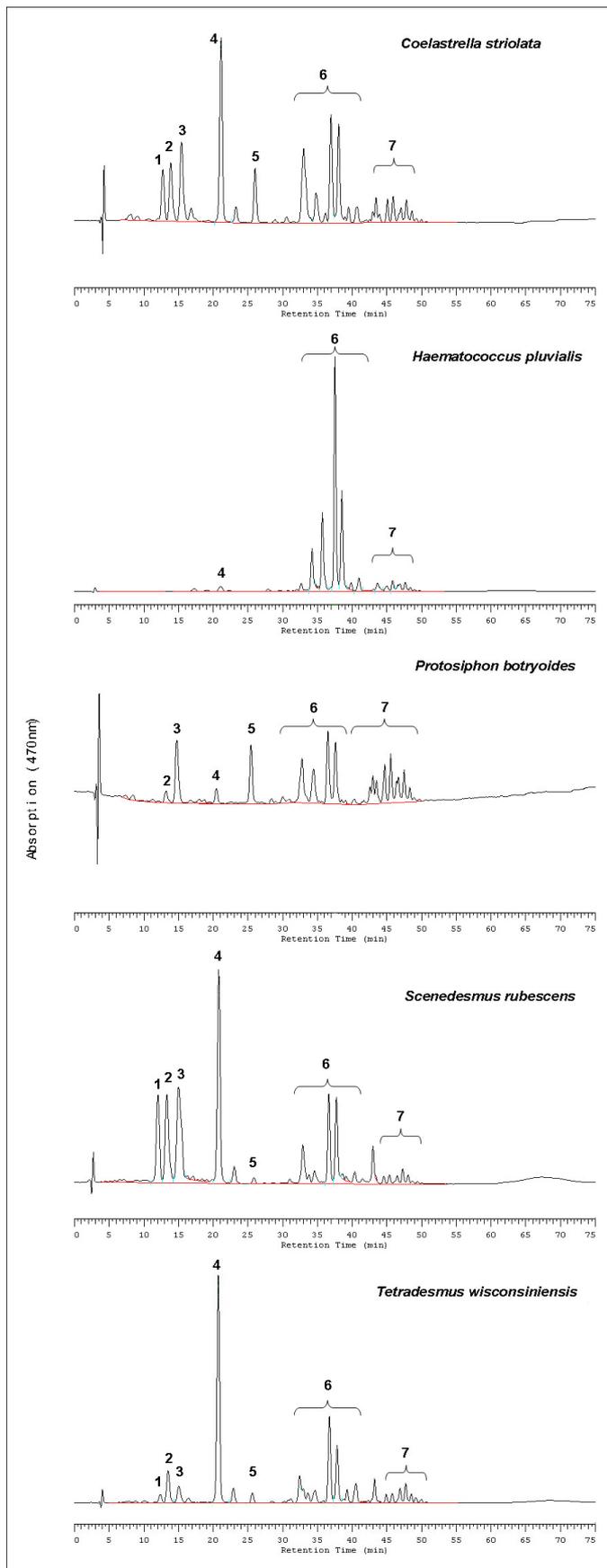


Abbildung 9 : HPLC-Chromatogramme der Pigmente einiger SC-haltiger Mikroalgen nach Beendigung der Stressexposition; 1 - Ax, 2 - Adonixanthin, 3 - Lutein, 4 - Cx, 5 - Chl. b, 6 - Carotinoidmonoester, 7 - Ax-DE

Lutein und β -Carotin wurden in Mikroalgen mit $> 1 \text{ mg/ g TS SC}$ im Durchschnitt in 4,4mal höheren Gehalten gemessen, als die weiteren primären Carotinoide Violaxanthin, Neoxanthin und Luteoxanthin (zusammengefasst als PC).

Neben dem Ax- und dem Gesamtcarotinoidgehalt wurden deutliche Unterschiede beim Veresterungsgrad der hydroxylierten SC gefunden. Die Elutionsprofile der HPLC-Chromatogramme (Abbildung 9 S.37) zeigen, dass sich die Carotinoidzusammensetzung einiger Mikroalgen wie *C. striolata* und *S. rubescens* nur geringfügig voneinander unterschieden, wohingegen das Chromatogramm von *H. pluvialis* den deutlich höheren Anteil an Carotinoidmonoestern im Vergleich zu den anderen Spezies darstellt.

Die Mikroalgen, deren Anteil an Fettsäuremono- und -diestern am Gesamtcarotinoidgehalt weitestgehend übereinstimmte, wurden in Gruppen zusammengefasst und in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14 : Anteil veresterter Carotinoide am Pigmentspektrum der untersuchten Mikroalgenarten

Anteil veresterter sekundärer Carotinoide					
< 20%		20 – 60%		> 80%	
<i>S. obliquus</i>	18,3	<i>M. zofingiensis</i>	52,1	<i>H. pluvialis</i>	96,0
<i>D. subspicatus</i>	12,8	<i>S. vacuolatus</i>	40,6	<i>P. botryoides</i>	85,0
<i>S. producto capitatus</i>	12,7	<i>C. striolata</i>	39,6		
<i>S. falcatus</i>	10,0	<i>S. costatus</i>	34,2		
<i>S. accuminatus</i>	4,2	<i>T. wisconsinensis</i>	32,2		
		<i>B. braunii</i>	29,4		
		<i>D. denticulatus</i>	25,7		
		<i>S. rubescens</i>	20,6		

P. botryoides und *H. pluvialis* wiesen einen 2,4 bzw. 2,8-fach höheren Anteil an Carotinoidestern auf als alle anderen untersuchten Mikroalgen. In den *Scenedesmus*-Spezies der Gruppe 2 (20-60% Carotinoidester) wurde ein Anteil von $34,3 \pm 8,7\%$ veresterter Carotinoide gemessen. Hier sind neben *S. rubescens* und *S. producto capitatus*, den *Scenedesmus*-Spezies mit den höchsten Gesamtcarotinoidgehalten dieser Gattung, auch die beiden Spezies mit Carotinoidgehalten von $>10 \text{ mg/ g TS}$ vertreten: *M. zofingiensis* und *T. wisconsinensis*. Die dritte Gruppe ($<20\%$ veresterte Carotinoide) enthielt im Durchschnitt $11,6 \pm 5,1\%$ Carotinoidester. In *S. accuminatus* trat mit $4,2\%$ der geringste Anteil veresterter Carotinoide auf, gleichzeitig war der Gehalt an Ax und der Gesamtcarotinoidgehalt jedoch sehr gering ($0,1 \pm 0,01 \text{ mg/ g}$ bzw. $0,95 \pm 0,07 \text{ mg/ g TS}$).

Da in *S. rubescens* und *S. producto capitatus* die höchsten Gesamtcarotinoidgehalte unter den *Scenedesmus*-Spezies aufwiesen und *S. rubescens* den höchsten absoluten Ax-Gehalt, wurden alle weiteren Untersuchungen zur Ax-Biosynthese mit diesen Organismen vergleichend mit *H. pluvialis* durchgeführt.

3.2 Klonierung eines β -Carotin-Ketolase-Gens (*BKT*) aus *Scenedesmus*

Da aus *Scenedesmus* keine Sequenz für das SC-Biosynthese-Gen *BKT* bekannt ist, wurden aus konservierten Bereichen der *BKT1*-Sequenz aus *H. pluvialis* degenerierte Primer abgeleitet (Fr. Dr. Rosahl). Nach der RNA-Isolierung aus carotinoidhaltiger Biomasse der Grünalge *S. producto capitatus* erfolgte die cDNA-Synthese. Die anschließende RT-PCR mit den degenerierten Primern ergab die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes von ca. 400 bp (s. Abbildung 10A, erwartete Bande: 396 bp). Eine Kolonie-PCR mit rekombinanten *E.coli*-Kolonien ergab 13 rekombinante Klone (s. Abbildung 10B). Nach der erfolgreichen Amplifizierung eines Fragmentes aus *S. producto capitatus* wurde diese PCR mit cDNA aus *S. rubescens* wiederholt. Im Gegensatz zu *S. producto capitatus* konnte jedoch mit den verwendeten degenerierten Primern aus *S. rubescens* keine Amplifizierung von *BKT*-Fragmenten nachgewiesen werden.

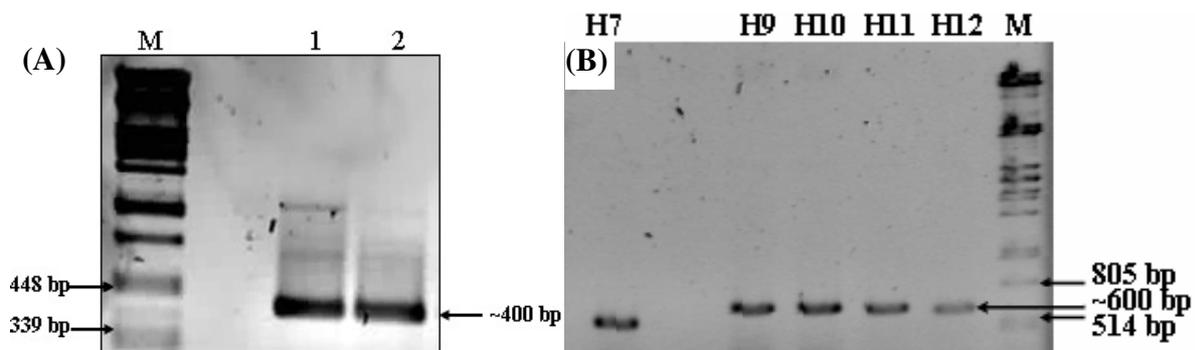


Abbildung 10: (A) PCR-Amplifizierung eines *BKT*-Genfragmentes aus *S. producto capitatus* mittels degenerierter Primer (abgeleitet von der *BKT*-Sequenz aus *H. pluvialis*, nach 1: cDNA-Synthese mit „random hexamer“ Primern und 2: cDNA-Synthese mit oligo(dT) Primern; M: Molekulargewichtsmarker λ -Pst; erwartete Bande bei 396 bp; (B) Kolonie-PCR-Produkte rekombinanter *E. coli*-Klone. *BKT*-Fragment aus (A) wurde in pCR2.1 Vektor kloniert und in *E. coli* transferiert, erwartete Bande bei 597 bp (PCR-Fragment plus Vektorsequenz)

Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz des *BKT*-Fragmentes aus *S. producto capitatus* sowie der Datenbankvergleich mit der Sequenz der *BKT* aus *H. pluvialis* auf Proteinebene ist in Abbildung 11 dargestellt.

Query	1	HWEHHNHT GQPHEDPDFHKGDPELLPWFLSFMXGYISIPQFVKLQATVLFMLYYGAPLPN	180
		HWEHHNHT G+ +DPDFHKG+P L+PWF SFM Y+S+ QF +L + + GAP+ N	
Sbjct	138	HWEHHNHT GEVKGKDPDFHKGNPLVWPFASFMSYMSLWQFARLAWWAVVMQMLGAPMAN	197
Query	181	MLLFWAGSGLVSAVRLFYFGTYVXHPRKG---ADEVMSWAKARSAMAPSALSFLRCYFF	351
		+L+F A + ++SA RLFY+GTY+ HKP G +VM+W +A+++ A +SFL CY F	
Sbjct	198	LLVFMAAAPILSAFRLFYFGTYLPHKPEPGPAAGSQVMAWFRAKTSEASDVMSFLTICYHF	257
Query	352	DMHWE HHRWPFAPWW	396
		D+HWE HHRWPFAPWW	
Sbjct	258	DLHWE HHRWPFAPWW	272

Abbildung 11: Aminosäure-Sequenz des *BKT*-Fragmentes aus *S. producto capitatus* nach NCBI-Datenbankabgleich mit der *BKT*-Sequenz des *H. pluvialis*, rote Bereiche: orthologe Aminosäure-Sequenzen, die zur Ableitung der degenerierten Primer verwendet wurden

Die Analyse des Sequenzierungsergebnisses zeigte, dass zehn der rekombinanten Klone DNA-Fragmente enthielten, deren abgeleitete Aminosäure-Sequenz eine 47-53%ige Sequenzorthologie zur abgeleiteten Aminosäure-Sequenz des *BKT*-Gens aus *H. pluvialis* aufwiesen. Es bestehen also deutliche Sequenzorthologien des klonierten *BKT*-Fragmentes aus *S. producto capitatus* und der bekannten *BKT*-Sequenz aus *H. pluvialis*.

Nach einem Vergleich aller erhaltenen Sequenzen konnten drei Klone mit durchgehendem Leseraster identifiziert werden (H12, H9 und O9), aus denen eine Mastersequenz abgeleitet wurde (H12, s. Anhang D). Von dieser neu gewonnenen Sequenz wurden im Folgenden H12-spezifische Primer abgeleitet, um die erzielten Ergebnisse zu überprüfen (Tabelle 15).

Tabelle 15: eingesetzte genspezifische Primerkombinationen für den Nachweis des *BKT*-Fragmentes in verschiedenen Grünalgen

PCR-Produkt	Primerkombination	Erwartetes Fragment (bp)
1a/ 1b	<i>BKT</i> test 3 / GSP 3	134
2a/ 2b	<i>BKT</i> test 5 / GSP 5	283
3a/3b	<i>BKT</i> test 5/ <i>BKT</i> test 3	305

Die elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte, die mit diesen genspezifischen Primern sowohl aus *S. producto capitatus* als auch aus *T. wisconsinensis* gewonnen werden konnten, ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

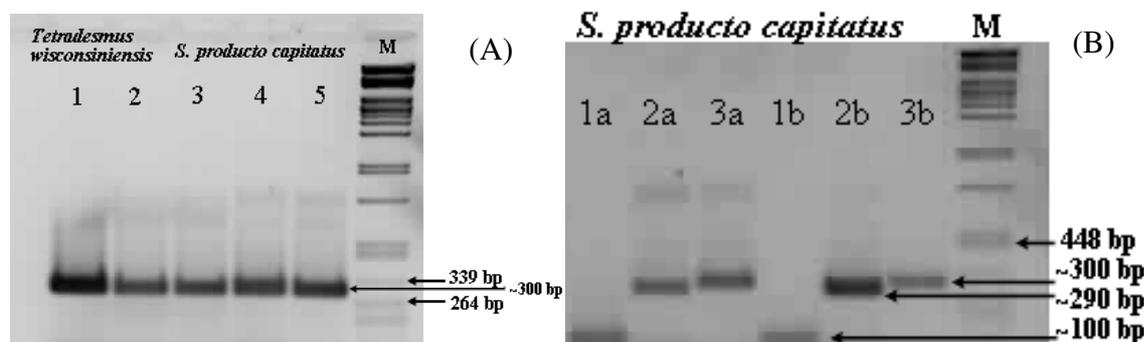


Abbildung 12: (A): PCR-Produkte des *BKT*-Fragmentes mit cDNA aus *S. producto capitatus* und *T. wisconsinensis*, Verwendung genspezifischer Primer *BKT* test 5&3, erwartete Bande: 305 bp; 1 -2 *T. wisconsinensis* (1: cDNA mit oligo(dT) Primern synthetisiert (=O), 2 cDNA mit „random hexamer“ Primern synthetisiert (=H)), 3 - 5 *S. producto capitatus* (3: Stressmedium BBM, H-Primer; 4 Stressmedium SS, H Primer, 5 Stressmedium SS, O Primer)

(B) PCR- Produkte des *BKT*-Fragmentes mit cDNA aus *S. producto capitatus* mit verschiedenen Primer-Kombinationen, erwartete Bande für Kombination 1: 134 bp, Kombination 2: 283 bp, Kombination 3: 305 bp; a: cDNA mit H-Primern synthetisiert, b: cDNA mit O-Primern synthetisiert

Das Vorhandensein des *BKT*-Gens konnte nach RNA-Isolierung und RT-PCR in *S. producto capitatus* mit allen eingesetzten genspezifischen Primerkombinationen in den erwarteten Fragmentgrößen nachgewiesen werden (s. Tabelle 15). Es konnte keine veränderte Expression des *BKT*-Gens in den Biomassen von *S. producto capitatus* gefunden werden, die mit zwei unterschiedli-

chen Stressmedien (Setlik- und BBM- Stress) kultiviert wurden. Darüber hinaus ergab die RT-PCR mit der cDNA aus *T. wisconsinensis* die Amplifizierung eines PCR-Produktes von ca. 300 bp, unabhängig von der Art der für die cDNA-Synthese eingesetzten Primer (Abbildung 12 (A)). Nachdem *BKT*-orthologe Sequenzen in *S. producto capitatus* nachgewiesen werden konnten, sollte die Expression der Gene durch Northern-Analysen auf mRNA-Ebene untersucht werden. Hierfür wurde sowohl von *S. producto capitatus* als auch von *S. rubescens* während der Stressexposition regelmäßig Probe genommen und die RNA isoliert. Eine radioaktiv markierte Sonde wurde aus der Mastersequenz H12 aus *S. producto capitatus* hergestellt. Die unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennte RNA, das Ergebnis des Northern-Blots sowie die SC-Gehalte sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

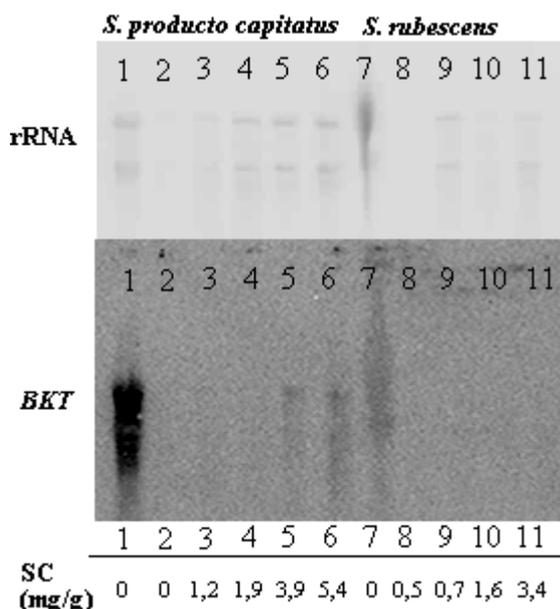


Abbildung 13 : gelelektrophoretisch getrennte RNA aus *S. producto capitatus* und *S. rubescens* und anschließende Northern-Analyse, Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (H12) (Induktion der SC-Biosynthese durch Starklicht ($I = 110 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) und Nitrat- und Phosphatmangel); RNA-Gel von *S. producto capitatus* (Spuren 1-6; 1 nach 6 h Stressexposition, 2 nach 2d, 3 nach 4d, 4 nach 6d, 5 nach 9d, 6 nach 12d) und *S. rubescens* (Spuren 7-11; 7 nach 6 h Stressexposition, 8 nach 4d, 9 nach 6d, 10 nach 10d, 11 nach 14d); zusätzlich ist der während der Stressexposition ansteigende Gehalt an freien SC dargestellt (mg/ g TS)

Das RNA-Gel zeigt v.a. ribosomale RNA. Die Proben 2 und 8 enthalten keine RNA, und die Probe 7 scheint verunreinigt zu sein. Der Northern-Blot dieses Gels zeigt eine starke Hybridisierung der Sonde direkt nach Induktion der SC-Biosynthese (6h) von *S. producto capitatus* sowie zwei sehr schwache Signale nach 9 bzw. 12 Tagen Stressexposition. In *S. rubescens* konnten bis auf eine unspezifische Färbung keine Signale erhalten werden.

Um den unbekanntem Bereich der *BKT*-Sequenz aus der carotinoidhaltigen Biomasse von *S. producto capitatus* in 5'-Richtung zu amplifizieren, wurde mit der RNA eine 5'-RACE-PCR durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte.

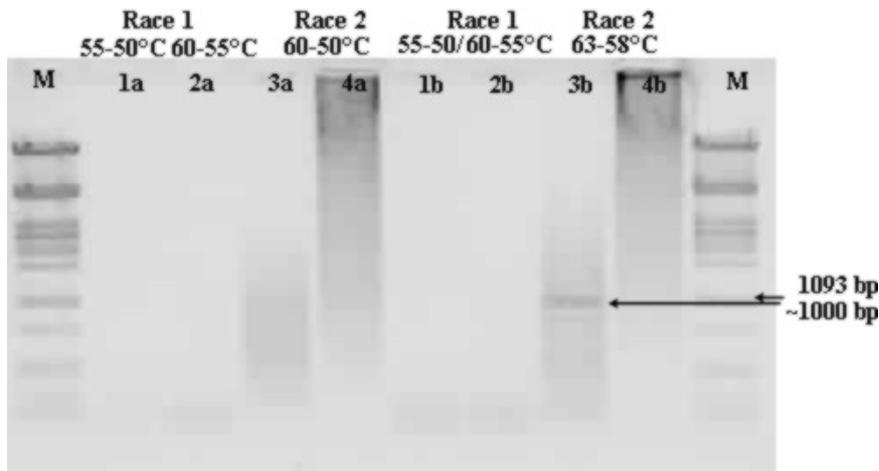


Abbildung 14 : 5'RACE-PCR mit RNA aus *S. producto capitatus* und zwei *BKT*-spezifischen Primern (RACE 1:GSP n1, RACE 2: GSP n2), M: λ -Pst Marker, Doppelansatz, a und b enthalten jeweils 0,8 μg RNA/ μL ; 1: RACE 1 ($\text{AT}_{\text{END}} = 50^\circ\text{C}$), 2: RACE 1 ($\text{AT}_{\text{END}} = 55^\circ\text{C}$), 3 a & 4 a: RACE 2 ($\text{AT}_{\text{END}} = 50^\circ\text{C}$), 3b & 4b: RACE 2 mit höherer Annealingtemperatur (touchdown auf 58°C)

Bei niedrigeren Annealingtemperaturen (touchdown auf 50°C) wurden in der ersten RACE-PCR (Spur 1a und 1b) keine sichtbaren und in der zweiten RACE-PCR (Spur 3a und 4a) nur unspezifische Produkte erhalten. Daher wurde die Endtemperatur im Annealing in der zweiten PCR auf 58°C erhöht, woraufhin eine Bande von ca. 1 kb erhalten wurde (Spur 3b), die isoliert, kloniert und nachfolgend sequenziert wurde. Im Ergebnis konnten verschiedene Klone mit einer maximalen Länge von 1,5 kb erhalten werden. Das Ergebnis der Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäure-Sequenz sowie der Abgleich der Sequenz mit der NCBI-Datenbank ist in Abbildung 15 dargestellt.

```

Query  409  ANPAEELGSWLEQYAMPDEMSELDGSSYSSRRDLQLAYLPPKSDLPGFAAAMGLITAW  588
      A  ++ L +W  QY++P E S                ++R L+ AY PP SD  G  A+ +I +W
Sbjct  27    AGSSDVLRTWATQYSLPSEES-----DAARPLKKNAYKPPPSDTKGITMALRVIGSW  78

Query  589  ACLFKHAIWGYDMFAPMTVPH-----LLDGLLTFASLEFVSTGLFITT  717
      A +F HAI+  +  +  H                      LLD ++ F  LEF+ TGLFITT
Sbjct  79    AAVFLHAIQIKLPTSLDQLHWLPVSDATAQLVSGTSSLLDIVVVFVLEFLYTGTFITT  138

Query  718  HDMSHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHDNTGQPHEPDFHKG  891
      HD+MHGT+  NR LND +G  CISLYAWFDY+M+  KHWEHH++TG+  +DPDFH+G
Sbjct  139  HDAMHGTIAMRNRQLNDFLGRVCIISLYAWFDYNMLHRKHWEHNNHTGEVKGDPDFHRG  196

Query  1362  FFAGDPALLPWFLSFMKGYISIPQFVKLQATVLSLMYGAPLPNMLLFWAGSGLVSAVRQ  1541
      F  G+P ++PWF SFM  Y+S+ QF +L  +  +  GAP+ N+L+F A  + ++SA R
Sbjct  193    FHRGNPGIVPWFASFMSYMSMWQFARLAWWTVVMQLLQAPMANLLVFMAAAPILSAFRL  252

Query  1542  AEFCRYPSHWRPLEHASRGNRPIL  1616
      F  Y  H +P  A+ G +  ++
Sbjct  253    FYFGTYMPH-KPEPGAASGSSPAVM  276
    
```

Abbildung 15: Sequenzvergleich der *BKT*-Sequenz (Klon B5) aus *S. producto capitatus* mit der NCBI-Datenbank auf Proteinebene, Ergebnis: 43% der AS sind identisch zur *BKT1* aus *H. pluvialis*, rote Bereiche: konservierter Bereich der Aminosäure-Sequenz, der für den degenerierten 5'-Primer verwendet wurde

Der Vergleich der neu erhaltenen *BKT*-Sequenz ergab im Bereich der Nukleotide 409 bis 891 eine Sequenzorthologie zwischen der *BKT* aus *H. pluvialis* und der *BKT* aus *S. producto capitatus*

von 43% der Aminosäuren. Im Bereich der ersten 409 Nukleotide wurden keine Orthologien gefunden, ebenso im Nukleotidbereich von 890 bis 1371, der ein Intron in der Nukleotidsequenz aufweist (Klon B5). Die abgeleitete Sequenz zwischen Nukleotid 1372 und 1524 ergab wiederum 35% identische AS. Eine noch größere Orthologie der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz konnte zwischen der *BKT* aus *S. producto capitatus* und der *BKT* aus *M. zofingiensis* (ehem. *Chlorella zofingiensis*) festgestellt werden, hier betrug die Identität 46% der AS.

Durch die 5'-RACE-PCR konnte die *BKT*-Sequenz, die zunächst mit Hilfe der degenerierten Primer amplifiziert wurde, um 150 Aminosäuren in 5'-Richtung (von AS 177 auf AS 27 der *BKT*-Sequenz von *H. pluvialis*) verlängert werden. Die Sequenzen der anderen positiven Klone sind dem Anhang D zu entnehmen. Der ORF der erhaltenen cDNA codiert ein Protein mit 258 AS, welches zur *BKT*-Sequenz von *M. zofingiensis* zu 46% und zur *BKT*-Sequenz von *H. pluvialis* zu 41% identisch ist. Durch die Variation der Annealingtemperatur während der RACE-PCR wurden anschließend verschiedene Klone erhalten, deren Struktur und Länge in der nachfolgenden Abbildung vergleichend dargestellt ist.

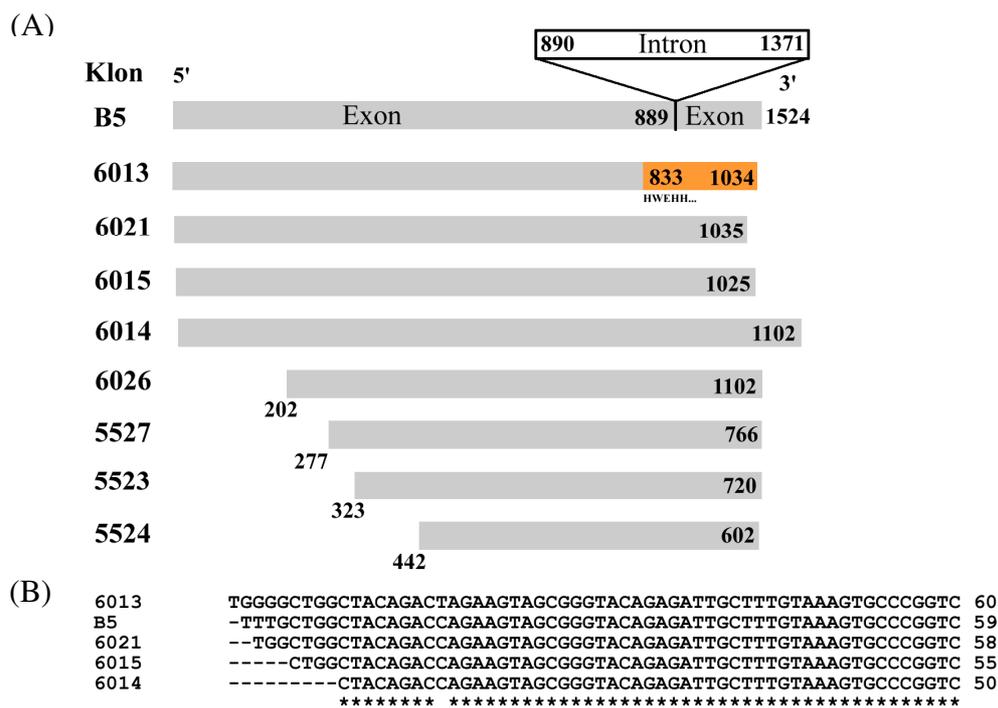


Abbildung 16: (A) Exon/ Intron Struktur und Länge der *BKT*-Nukleotidsequenz (bp) der 5'-RACE-Klone aus *S. producto capitatus*, Start im Vergleich zum Klon 6013; oranger Bereich: Beginn des *BKT*-Fragmentes nach PCR mit degenerierten Primern (vgl. Abbildung 11, S.39);

(B) Multiples Sequenz-Alignment (ClustalW 2.0.5) der Nukleotidsequenz der Klone 6013, B5, 6021, 6015 und 6014 des *BKT*-Fragmentes aus *S. producto capitatus*, unterschiedliche Länge der Klone in 5'-Richtung der *BKT*-Sequenz

Die Auswertung der mit Hilfe von Ulrike Smolka und der MWG Biotechn AG (Ebersberg) sequenzierten Klone ergab, dass der Klon 6013 die größte Verlängerung in Richtung 5'Ende der

cDNA enthielt (832 Nukleotide). Der Klon B5 weist jedoch mit 1041 bp die längste Nukleotidsequenz auf. 136 Nukleotide vom Start befindet sich das erste Methionin, das offene Leseraster enthält 299 AS. Im Klon B5 konnte, im Gegensatz zu den anderen Klonen, ein Intron von 482 bp Länge gefunden werden. Nach einem Sequenz-Alignment aller Klone (aus Klon B5 wurde das Intron entfernt) ergab sich eine Homologie von 95-99% in der Nukleotidsequenz. Das vollständige Alignment der Nukleotidsequenz als auch der Proteinsequenz der Klone ist dem Anhang D zu entnehmen.

Die erhaltene Aminosäure-Sequenz (Klon 6013 + Klon H12) wurde auf Proteinebene auf Strukturinformationen hin untersucht: mit 78%iger Wahrscheinlichkeit liegt keine plastidäre oder mitochondriale Targeting Sequenz vor (Programm: Predotar 1.03). Die Suche nach Proteinfamilien und Domänen ergab das Vorhandensein von vier Transmembran-Regionen, sowie eine Verwandtschaft zur Fettsäure-Desaturase Typ I (InterProScan 4.3).

3.3 Analytik der Carotinoide

3.3.1 Ax-Z,E-Isomere

Da die Ax-Z,E-Isomere unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen, sollten im Folgenden die auftretenden geometrischen Isomere analysiert werden. Das Erhitzen eines all-E-Standards in Acetonitril bis zur Siedetemperatur erzielte im Vergleich zur Bestrahlung mit Licht die größte Ausbeute einer Reihe von Z-Isomeren. Die chromatographische Trennung erfolgte vergleichend an einer RP18- und einer RP30-Phase, die Chromatogramme sind in Abbildung 17 dargestellt.

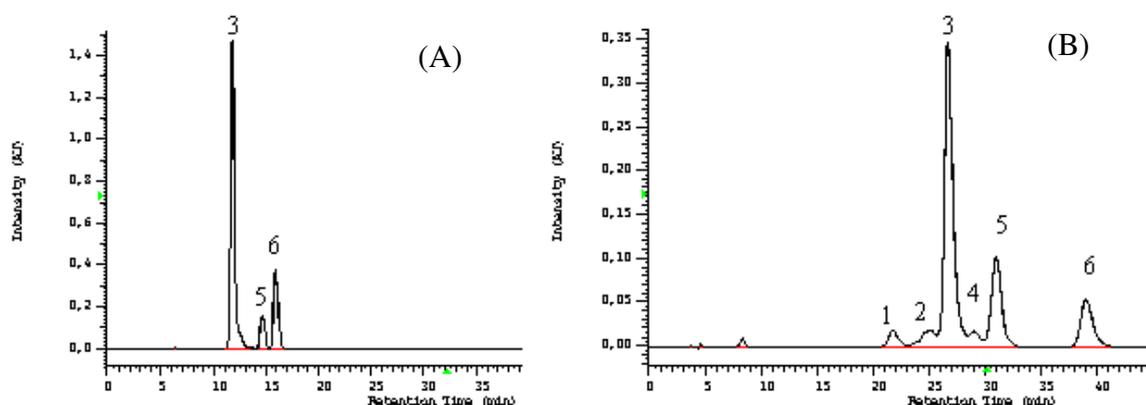


Abbildung 17 : HPLC-Chromatogramm der geometrischen Ax-Isomere, Laufmittel: Aceton/Wasser 78:22 (v/v), 0,6 mL/ min, 25°C, Detektion: 470 nm; (A): RP18-Phase, (B): RP30-Phase, 5 µm, 250*4 mm, Peakidentifizierung s. Tabelle 16, S.45)

Das Chromatogramm der RP18-Phase zeigt neben dem Hauptpeak 3 (nicht isomerisiertes all-E-Ax) 2 Isomere, die mittels DAD-Detektion anhand eines neu entstandenen Absorptionsmaxi-

mums bei 373 nm (dem sogenannten „Z-Peak“ vgl. 1.2.7) identifiziert wurden (s. Abbildung 18). Im Gegensatz hierzu ergibt die Trennung derselben Probe an der RP30-Phase eine Trennung von drei zusätzlichen Peaks. Die vorläufige Identifizierung ist Tabelle 16 zu entnehmen.

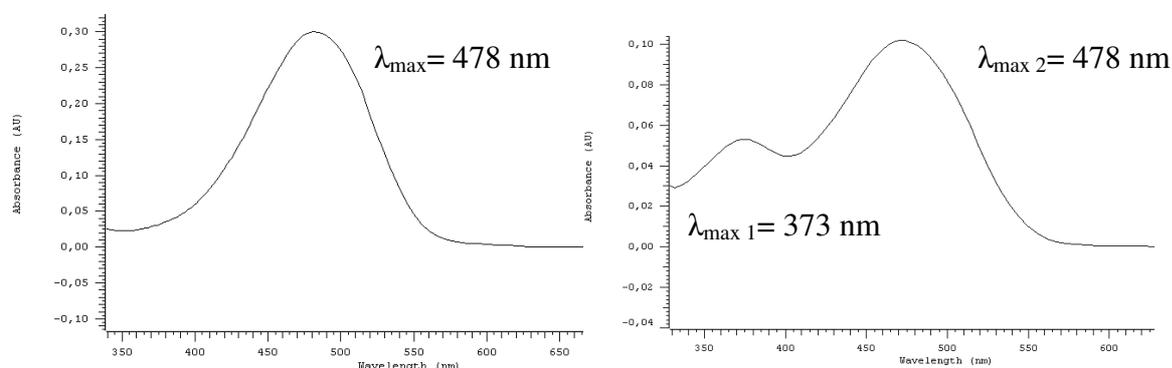


Abbildung 18: UV/Vis Spektren des all-*E*-Ax (Peak 3) und des 15-*Z*-Ax (Peak 4) aus Abbildung 17, S. 44, durch die *Z*-Isomerisierung entsteht ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 373 nm

Die relative Intensität des *Z*-Peaks wurde zur Identifizierung der (*Z*)-Isomere herangezogen. Unter der Annahme, dass die Position der isomerisierten Doppelbindung in *Z*-Konformation die Absorptionsintensität der *Z*-Bande beeinflusst, wurden folgende, vorläufige Identifizierungen vorgenommen.

Tabelle 16: Absorptionsmaxima von thermisch isomerisiertem all-*E*-Ax nach chromatographischer Trennung an einer RP18- sowie einer RP30-Phase

Peak	RP18	Fläche in %	RP30	Fläche in %	λ_{\max} [nm]	Q	Verbindung
1	-	-	+	3,4	463	-	n.i.
2	-	-	+	5,1	463	-	n.i.
3	+	69,4	+	58,2	478	-	all- <i>E</i> -Ax
4	-	-	+	1,2	373; 478	1,9	15- <i>Z</i> -Ax
5	+	20,4	+	19,7	373; 478	2,3	13- <i>Z</i> -Ax
6	+	10,2	+	12,4	373; 478	4,9	9- <i>Z</i> -Ax

13-*Z*-Ax und 9-*Z*-Ax wurden unter sonst identischen Chromatographiebedingungen von der RP18-Säule vom all-*E*-Ax getrennt. Der Einsatz einer RP30-Säule löste zusätzlich drei Peaks auf, die mit der RP18-Säule nicht getrennt werden konnten. Dazu zählte das 15-*Z*-Ax, welches auch nach der Optimierung von Eluentenzusammensetzung und Fließgeschwindigkeit an der RP18-Säule nicht getrennt wurde.

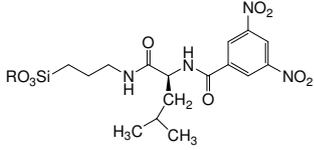
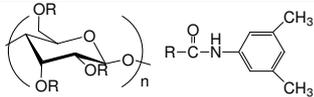
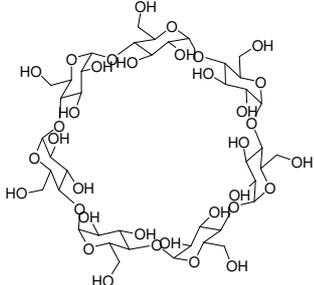
Nach der Trennung verschiedener SC-haltiger Extrakte aus *S. rubescens* ergaben die mittels DAD aufgenommenen Carotinoidspektren, dass Ax nur in der all-*E*-Form enthalten war.

3.3.2 Ax-*R,S*-Isomere

Um die Ax-Konfiguration aus verschiedenen biologischen Quellen ohne vorherige chemische Modifizierung bestimmen zu können, sollte eine chirale Trennmethode zur Trennung der chira-

len Ax-Isomere entwickelt werden. Grundsätzlich wurden drei verschiedene Typen chiraler stationärer Phasen (CSP) für die Trennung der Ax-Isomere eingesetzt: Dinitrobenzoyl-Aminosäurederivate (Pirkle-*L*-Leucin und Pirkle-*R,R*-ULMO), modifizierte Polysaccharide (Cellulose-basierte Phenylcarbamate) und ein β -Cyclodextrin. Die verwendeten CSP und die erzielten Trennergebnisse sind nach ihrem Wechselwirkungsprinzip mit dem Analyten in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung aller zur Enantiomerentrennung von Ax eingesetzten chiralen stationären Phasen (CSP)

CSP	Struktur	CSP Typ*	Retentionsprinzip	NP/ RP	Trennung
Pirkle Phasen (<i>R,R</i> Ulmo und <i>L</i> -Leucin)	 <i>L</i> -Leucin	I	π - π Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Dipol	NP	nein
Modifizierte Polysaccharide (Chiralcel AD, OB, OC und OD-RH);	 Chiralcel OD-RH	II	s. Typ I, zusätzlich Einschlussprinzip	NP RP	nein ja
Chiragrom (Typ 1, 2 und 10)	n.b.	II		NP	nein
β -Cyclodextrin		III	Einschlussprinzip	RP	nein

* nach (Wainer, 1987), n.b. nicht bekannt

Obwohl zehn verschiedene stationäre Phasen für die enantioselektive Trennung von Ax eingesetzt wurden, konnte eine hinreichende HPLC-Trennung aller auftretenden Stereoisomere nur mit der Cellulose-tris-3,5-dimethyl-phenylcarbamate-Säule (Chiralcel OD-RH, Daicel) unter Verwendung eines Acetonitril- 3,5 mM Phosphorsäure-Gemisches erzielt werden (RP-Bedingungen).

Abbildung 19 zeigt die chromatographische Trennung eines synthetisch hergestellten Isomerenmischens. Das *S,S*-Enantiomer eluiert aufgrund des RP-Modus vor dem optisch inaktiven *R,S*-Isomer und dem *R,R*-Enantiomer. Dabei ist der Einfluss eines höheren wässrigen Anteils in der mobilen Phase dargestellt, um eine vollständige Basislinientrennung der *R,S*- und der *R,R*-Form zu erzielen. Durch die Erhöhung des wässrigen Anteils im Eluenten wurde die Enantioselektivität leicht erhöht, die Auflösung für das *S,S*- und das *R,R*-Isomer stieg von 2,27 auf 2,8 (vgl. Anhang E), wobei das *S,S*-Enantiomer vom *R,S*-Isomer nicht vollständig getrennt werden konnte. Die

Erhöhung des wässrigen Anteils auf 35% im Eluenten führte zu einer vollständigen Abtrennung des 3*S*,3'*S*-Peaks von der meso-Form des Ax, was jedoch aufgrund der hohen Retentionszeiten mit einer starken Peakverbreiterung gekoppelt war. Das quantitative Verhältnis der Stereoisomere betrug 1:2:1, und die Nachweisgrenze ($S/N = 3$), die im Bereich 0,1 bis 0,7 mg/ mL untersucht wurde, lag bei 500 ng/ mL.

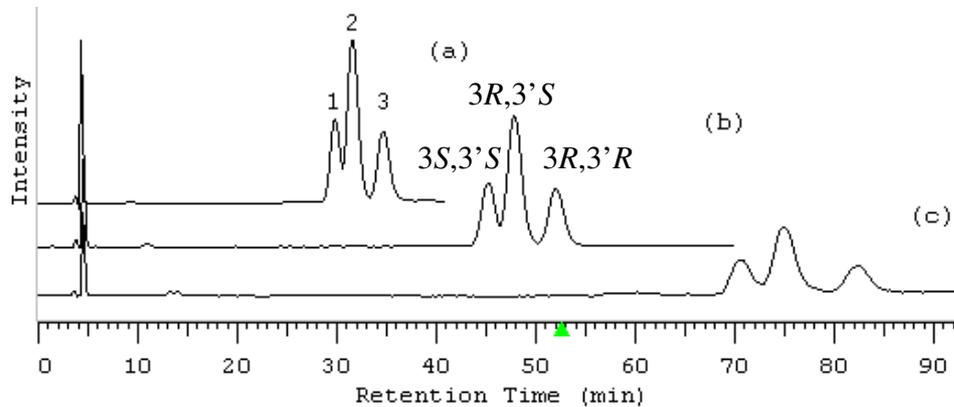


Abbildung 19 : HPLC-Chromatogramm einer chiralen Trennung eines all-*E*-Ax-Isomerengemisches ((1) 3*S*,3'*S*; (2) 3*R*,3'*S* und (3) 3*R*,3'*R*) an einer Chiralcel OD-RH-Säule (5 μ m, 150*4,6 mm I.D.), 25°C, 0,5 mL/ min, mobile Phase: Acetonitril/ 3,5 mmol H₃PO₄ (pH = 2,6), (a) 75/25 v/v; (b) 70/30 v/v; (c) 65/35 v/v, Detektion: 470 nm

Die entwickelte Methode zur chiralen Trennung der Ax-Enantiomere wurde im Folgenden eingesetzt, um die Ax-Enantiomere, die in der Mikroalge *Scenedesmus rubescens* und in der Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* auftreten, zu bestimmen. Das Ax wurde nach der Isolierung aus den entsprechenden Biomassen analysiert (Abbildung 20).

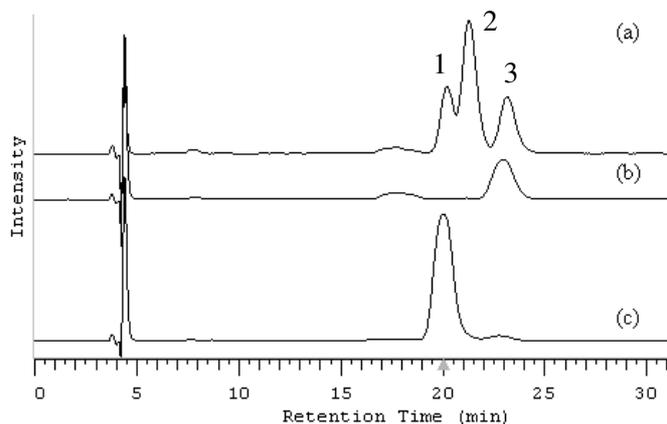


Abbildung 20 : HPLC-Chromatogramm des synthetischen Ax (a) im Vergleich zum Ax aus *Xanthophyllomyces* (b) und *Scenedesmus rubescens* (c); 1 - 3*S*,3'*S* -Ax, 2 - 3*R*,3'*S*-Ax und 3*R*,3'*R*-Ax, Chiralcel OD-RH Säule (5 μ m, 150*4,6 mm I.D.), 25 °C, mobile Phase: Acetonitril/ 3,5 mM H₃PO₄ (pH = 2,6) 85/15 v/v, Fluss: 0,5 mL/ min, Detektion: 470 nm

Um die Elutionszeiten möglichst niedrig zu halten, wurde ein höherer Anteil Acetonitril in der mobilen Phase gewählt (85/15 ACN/ 3,5 mM H₃PO₄ v/v (pH = 2,6)). Das Chromatogramm zeigt, dass die Hefe Ax hauptsächlich in der *R,R*-Konfiguration enthält, wohingegen *Scenedesmus* Ax überwiegend in der *S,S*-Form produziert.

3.3.3 LC-MS-Analyse von Carotinoiden und Carotinoideestern

3.3.3.1 Carotinoid-Referenzsubstanzen

Um die gebildeten Carotinoide und deren Fettsäureester eindeutig identifizieren zu können, wurde eine RP30-HPLC-DAD-APCI-MS-Methode entwickelt, welche die selektive chromatographische Trennung der HPLC mit der massenselektiven Bestimmung mittels Ionenfalle verbindet. Problematisch erwies sich zunächst eine Ionisierung der Carotinoide mittels ESI (Elektrospray-Ionisation). Diese Ionisierungstechnik zeigte weder im positiven noch im negativen Modus Ionen-Ausbeuten im erwarteten Massenbereich. Die Verwendung einer weiteren Ionisierungstechnik, der APCI (chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck) erzielte hingegen hohe Ionen-ausbeuten. Im Folgenden wurden die Massenspektren, die MS²- und MS³-Spektren der Referenz-carotinoide aufgenommen, um deren Ionisierungsverhalten und Fragmentierungsmuster zu untersuchen. Das Fragmentierungsmuster des Ax ist in Abbildung 21 dargestellt.

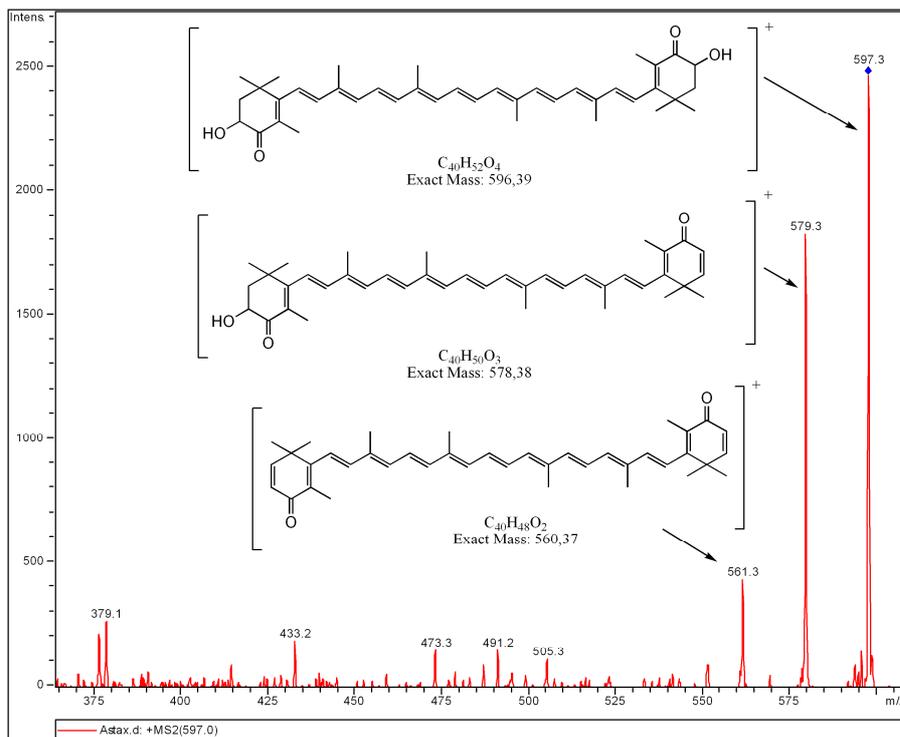


Abbildung 21 : MS³-Spektrum von Ax, Mutterion: m/z 597,3 ; Tochterion 1: m/z 579,3; Tochterion 2: m/z 561,3

Das einfache MS-Spektrum des Ax zeigte zunächst das quasimolekulare Ion $[M+H]^+$, welches der m/z von 597,3 entspricht. Im Fragmentierungsbild ergab sich pro Fragmentierungsstufe jeweils eine Wasserabspaltung $[M-18]$. Bei weiterer Fragmentierung (ab MS⁴) traten Ketteneliminierungen auf, woraus ein untypisches Fragmentierungsmuster mit einer Vielzahl von Peaks mit sehr geringen Intensitäten im unteren Massenbereich resultiert. Im Anhang E sind alle für diese Arbeit relevanten Carotinoide, deren theoretische und mittels (APCI)⁺MS ermittelten

Massen und deren relative Isotopenhäufigkeiten dargestellt. Von allen untersuchten Carotinoiden konnten die einfach protonierten quasimolekularen Ionen $[M+H]^+$ detektiert werden. Unter den verwendeten Ionisierungs- und MS-Bedingungen lässt sich deutlich erkennen, dass Ketocarotinoide wie Cx und Echinenon fast ausschließlich einfach protonierte Ionen der tatsächlichen Molekülmasse bildeten. Im Gegensatz dazu wurden von den Xanthophyllen Neoxanthin und Violaxanthin sowie von Lutein und Zeaxanthin mit großer Häufigkeit Basispeaks, die Fragmente des Carotinoidmoleküls darstellten (vgl. Abbildung 22), detektiert.

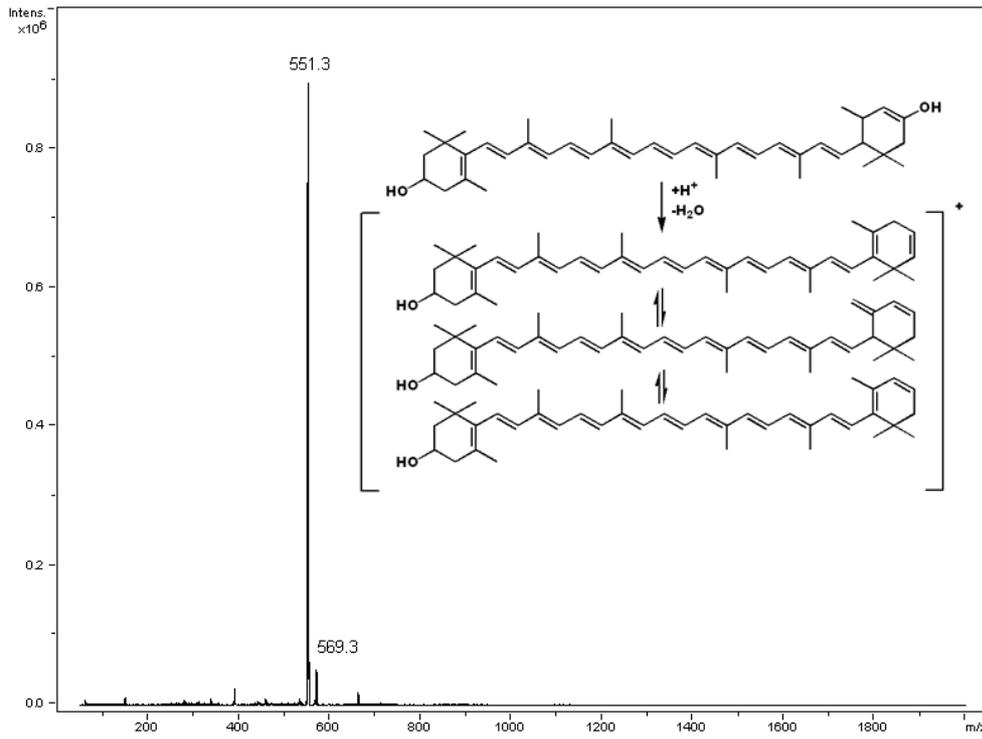


Abbildung 22 : MS-Spektrum der Xanthophylls Lutein

Lutein bildete als Basispeak nicht das Ion der theoretischen Masse $[M+H]^+$ 569,3 m/z, sondern das Ion mit der Masse 551,3 m/z $[M+H-H_2O]^+$. Nach der Protonierung erfolgt spontan eine Wasserabspaltung, die das Entstehen von mesomeren Grenzstrukturen ermöglicht (s. Abbildung 22). Im Gegensatz dazu wird Zeaxanthin einfach protoniert und daher als quasimolekulares Ion mit der Masse 569,3 m/z detektiert $[M+H]^+$.

Diese Wasserabspaltung wurde ebenfalls bei den Carotinoidmono- und diestern beobachtet. Bei Carotinoidmonoestern erfolgt eine einfache, bei Carotinoiddiestern eine doppelte Wasserabspaltung, welche mit dem Verlust der entsprechenden Fettsäure verbunden war. Daher entsteht, neben dem Massenpeak für den Ester, ein weiterer Peak, der die Strukturinformation über das betreffende Carotinoid enthält. In der folgenden Tabelle ist das Ionisierungs- bzw. Fragmentierungsverhalten der Carotinoide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Grünalgen mit Fettsäuren verestert gemessen wurden, dargestellt. Auf Grundlage dieser Fragmente und in Kombi-

nation mit den spektralen Daten des DAD wurde die Strukturaufklärung der Carotinoidester in der vorliegenden Arbeit vorgenommen.

Tabelle 18 : Ionisierungs- bzw. Fragmentierungsschema für ausgewählte Carotinoide und ihre Fettsäureester (Massenpeaks in m/z)

	Ax	Adonixanthin	Adonirubin	Lutein
Freies Carotinoid	597,3	583,3	581,3	551,3
Carotinoidmonoester	579,3	565,3	563,3	533,3
Carotinoiddiester	561,3	547,3	-	533,3

Die entwickelte LC-MS-Methode wurde im Folgenden zur Identifizierung von Carotinoideestern in Pflanzen und Algen eingesetzt.

3.3.3.2 Carotinoidspektrum in *Haematococcus pluvialis*

Da die Ax-Ester nicht als Referenzsubstanzen erhältlich sind bzw. keine weiteren natürlichen Quellen mit definierter Ax-Esterzusammensetzung existieren, erfolgte deren Identifizierung über Massenspektren. Das HPLC-Chromatogramm in Abbildung 23 zeigt das typische Profil des Carotinoidspektrums des *H. pluvialis*.

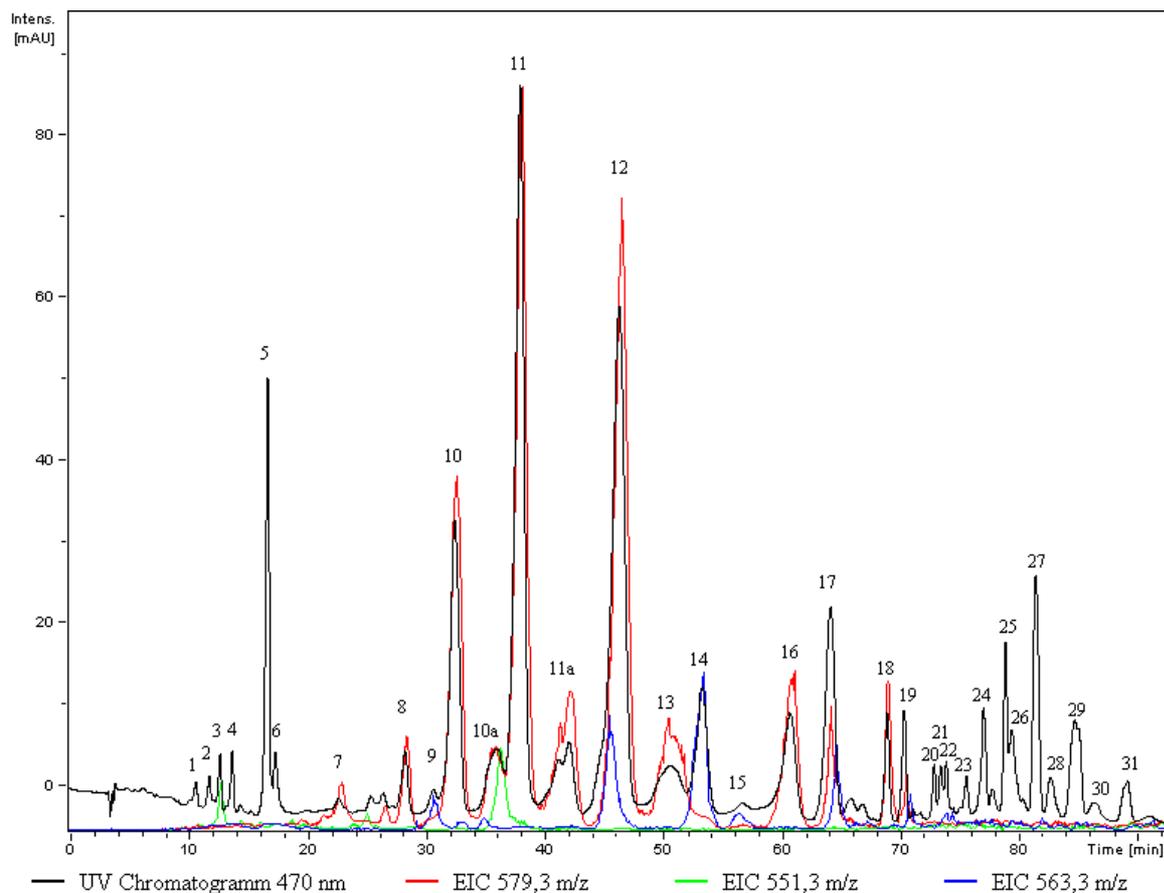


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm eines *H. pluvialis* Extraktes nach 46 Tagen (Bedingungen: BB-Medium, $V_R = 2L$, $I = 350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$, 3,3 vvm), Säule: RP30 (5 μm , 250*4mm), $25^\circ C$; Peakidentifizierung s. Tabelle 19, S. 52

Aufgrund ihrer molekulspezifischen Polarität eluieren die Carotinoide in drei Gruppen mit folgenden Retentionszeiten: unveresterte (freie) Carotinoide (10-18 min), Carotinoidmonoester (20-71 min) und Carotinoiddiester (72-82 min).

Charakteristisch für das Auftreten der Ax-DE ist auch hier das Fragment mit der m/z 579,3, welches der Molmasse des protonierten Ax $[M+H-H_2O]^+$ unter einfacher Wasserabspaltung entspricht. Die Abbildung 24 zeigt das Massenspektrum eines Ax-MEs (Ax-Linoleat) aus *H. pluvialis*.

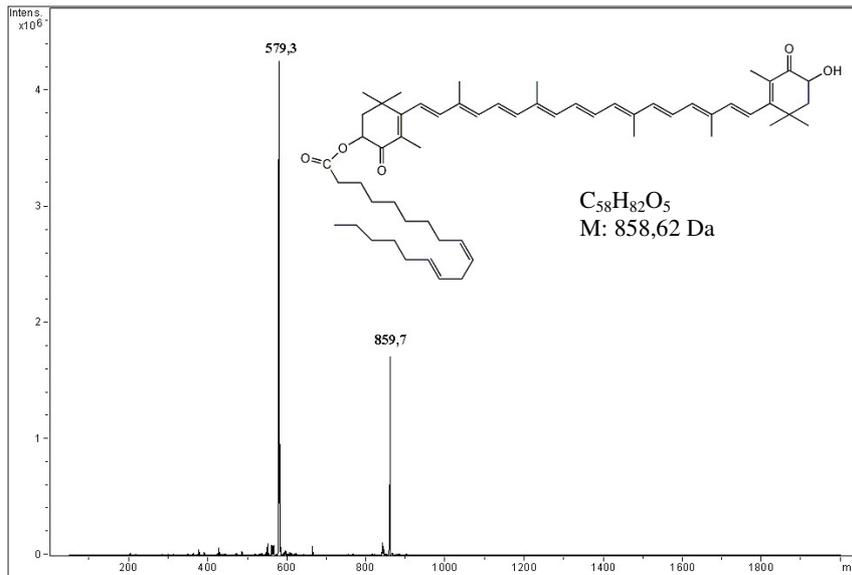


Abbildung 24 : Massenspektrum (APCI, positiv) des Ax-Linoleats (Ax-C18:2); Peak Nr. 11, Interpretation der Massenpeaks: m/z 859,7 $[M+H]^+$ Ax-C18:2; 579,3 $[M-FS-H_2O+H]^+$

Das quasimolekulare Ion $[M+H]^+$ des Ax-DE wird nur in geringerer Isotopenhäufigkeit detektiert als das Monoesterfragment und das freie Ax-Ion.

Das Ionenchromatogramm der m/z 551,3 zeigt jedoch zusätzlich die Koelution eines Luteinmonoesters mit der m/z von 789,7 zusammen mit Ax-Linolenat (m/z 857,7). Darüber hinaus konnten fünf Adonirubinmonoester identifiziert werden, die jeweils mit einem Ax-ME eluierten. Obwohl ein langsam ansteigender Gradient über eine Laufzeit von 90 Minuten verwendet wurde, konnte nicht jede einzelne Verbindung getrennt werden.

Der Massenpeak (m/z) 859,7 (Abbildung 24) entspricht dem protonierten quasimolekularen Ion des Ax-Linoleats (Ax-C18:2). Das Ion mit der höchsten Intensität entspricht der Masse von Ax- H_2O , die abgespaltene Fettsäure Linolsäure (m/z 280) konnte nicht detektiert werden. Aus diesem Grund wurden alle Fettsäurereste aufgrund der Massendifferenz der relativen Molekülmasse des Carotinoidesters und des entsprechenden Carotinoides berechnet.

Das Fragmentierungsmuster der Ax-Ester entsteht durch die Abspaltung einer oder beider Fettsäurereste als ungeladene Moleküle. Für die Identifizierung der Carotinoiddiester erlaubt das

Auftreten der Fragmente mit der Molekülmasse der Monoester die Identifizierung beider Fettsäuren. Die Differenz zwischen der Molmasse des Diesters und des Monoesters entspricht der Masse der ersten Fettsäure, während die Differenz zwischen Monoester und dem freien Carotinoid der Masse der zweiten Fettsäure entspricht. Diese Vermutung wurde durch MS²- und MS³-Experimente der Ax-DE bestätigt und ist am Beispiel des Ax-di-linoleats in Abbildung 25 dargestellt. Wenn verschiedene Fettsäuren am Carotinoid gebunden sind, wurden zwei Massenpeaks im Massenbereich der Monoester erhalten.

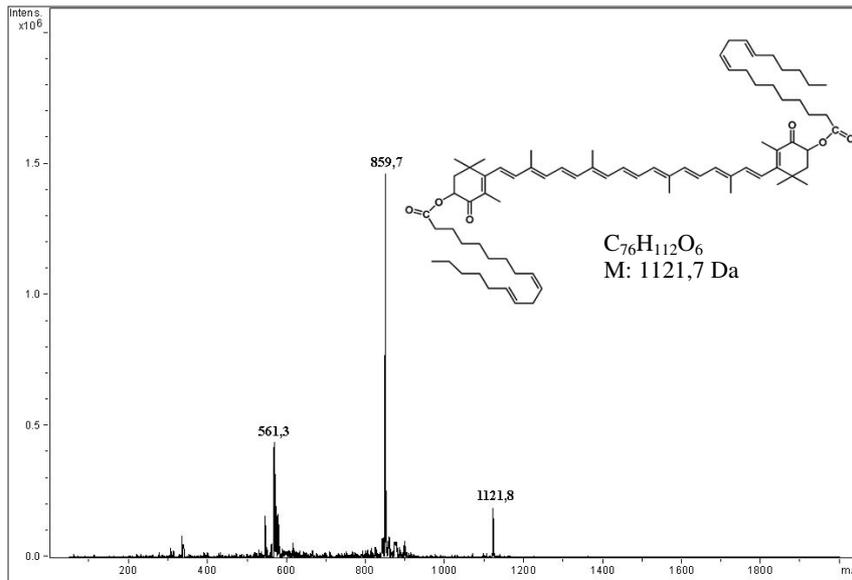


Abbildung 25 : Massenspektrum (APCI, positiv) Ax-di-Linoleat (Ax-C18:2/C18:2); Peak Nr. 24, Interpretation der Massenpeaks: m/z 1121,8 [M+H]⁺; 859,7 [M-FS1+H]⁺ Ax-C18:2, 561,3 [M-2*FS2*H₂O +H]⁺

Tabelle 19 : Carotinoidzusammensetzung im *H. pluvialis*-Extrakt nach LC-MS-Analyse

Peak Nr.	t _r	m/z	Verbindung	Anteil (%)
1	10,7	597,3	Astaxanthin	0,27
2	11,8	565,3	Adonixanthin	0,37
3	12,7	551,3	Lutein	0,51
4	13,7	581,3	Adonirubin	0,57
5	16,6	565,3	Canthaxanthin	4,5
6	17,4	565,3	Z-Canthaxanthin	0,63
7	22,7	835,7	Ax-C16:0	0,29
8	28,3	855,7	Ax-C18:4	1,2
9	30,6	819,7	Adonirubin-C16:0	0,43
10	32,4	857,7	Ax-C18:3	7,6
10a	36,0	857,7 / 831,7	Ax-C18:3/ Lut-C18:2	1,3/ 1,2
11	37,9	859,7	Ax-C18:2	18,18
11a	41,9	859,7	Ax-C18:2	3,1
12	46,3	861,7 / 841,7	Ax-C18:1/ Adonirubin-C18:3	15,9/ 3,02
13	50,5	847,7	Ax-C17:1	3,9
14	53,2	843,7	Adonirubin-C18:2	5,3
15	56,6	845,7	Adonirubin-C18:1	0,15
16	60,6	863,7	Ax-C18:0	4,0
17	63,9	883,7/ 847,7	Ax-C20:4/ Adonirubin-C18:0	3,6/ 3,1
18	68,7	887,7	Ax-C20:2	1,39

Peak Nr.	t _r	m/z	Verbindung	Anteil (%)
19	70,1	891,7 / 537,3	Ax-C20:0 / β-Carotin	0,31/ 1,04
20	72,7	1089,7 / 857,7	Ax-C18:3/C16:3	0,61
21	73,2	1115,8 / 857,7	Ax-C18:4/C18:3	0,63
22	73,7	1117,8 / 857,7	Ax-C18:3/C18:3	0,7
23	75,4	1119,8 / 857,7	Ax-C18:3/C18:2	0,4
24	76,9	1121,8 / 859,7	Ax-C18:2/C18:2	1,8
25	78,6	1121,8 / 859,7	Ax-C18:2/C18:2	1,95
26	79,1	1123,8 / 859,7	Ax-C18:2/C18:1	2,16
27	81,2	1123,8 / 859,7	Ax-C18:2/C18:1	4,0
28	82,4	1125,8 / 861,7	Ax-C18:1/C18:1	1,02
29	84,4	1125,8 / 861,7	Ax-C18:1/C18:1	3,03
30	86,1	1127,8 / 863,7	Ax-C18:1/C18:0	0,74
31	88,9	1153,8 / 891,7	Ax-C18:2/C20:0	1,1

Das detektierte Fettsäure-Carotinoidspektrum ist sehr komplex, insgesamt wurden zwölf Ax-ME, fünf Adonirubinmonoester, ein Luteinmonoester und zwölf Ax-DE identifiziert. Es konnten 31 Peaks getrennt und 37 Verbindungen im Extrakt des *H. puvialis* identifiziert werden. Die prozentuale Verteilung der Carotinoidmonoester, die 73,96% der detektierten Carotinoide ausmachten, teilte sich wie folgt auf: 60,77% Ax-Ester, 12% Adonirubinester und 1,2% Luteinester. Die Verbindung, die mit 21,28% der Carotinoide den größten Anteil ausmachte, ist Ax-C18:2 (Ax-Linoleat) gefolgt von Ax-C18:1 (Ax-Oleat, 15,9%). Hierzu in guter Übereinstimmung war der Ax-DE mit dem größten Anteil im Extrakt Ax-C18:2/C18:1. Neben den gesättigten C16-, C18-, und C20-Verbindungen, wurden auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie C18:3 (Linolensäure), C18:4 (Stearidonsäure) und C20:4 (Arachidonsäure) identifiziert.

3.3.3.3 Carotinoidspektrum in *S. rubescens*

Das Phänomen der Abspaltung der Hydroxylgruppe in Form von Wasser vom Carotinoidgerüst wurde in SC-haltigen Extrakten des *S. rubescens* weiter untersucht, der eine veränderte Mischung an Carotinoidestern in Bezug auf die Carotinoidgerüste enthält als *H. puvialis*. Ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm nach 14 Tagen Stressexposition ist in Abbildung 26, S.54 dargestellt, die Retentionszeiten und die detektierten Molekülmassen der identifizierten Verbindungen sind aus Tabelle 20, S. 54 zu entnehmen. Die freien Carotinoide bestanden hauptsächlich aus Ax, Adonixanthin, Lutein und Cx, es wurden zusätzlich Zeaxanthin und Echinenon detektiert. Nach 14 Tagen Stressexposition waren auch noch die Chlorophylle a und b nachweisbar. Die Ax-ME eluierten im Bereich von 36 bis 47 Minuten und stellten mit einem Anteil von 20,8% den Hauptanteil der Carotinoidmonoester in *S. rubescens* dar. Die beiden Hauptkomponenten waren Ax-Stearat (8,1%) bzw. Ax-Oleat (6,6%).

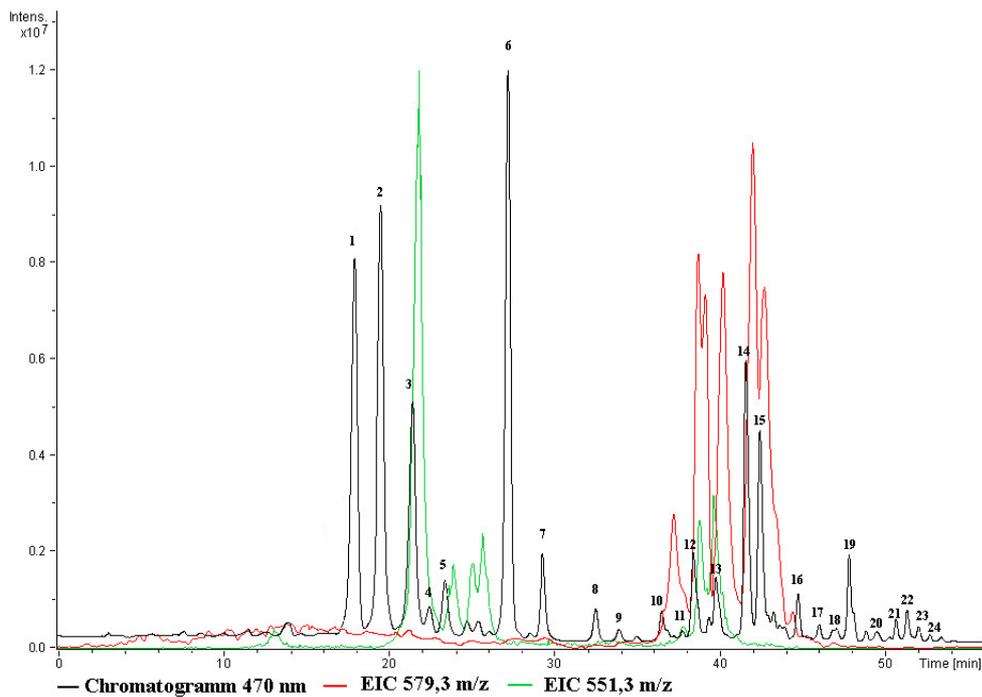


Abbildung 26 : HPLC-Chromatogramm (470 nm) und Ionenchromatogramm (m/z = 551,3 und m/z = 579,3) eines Extraktes aus *S. rubescens* nach 14 d Stressexposition (Bedingungen: SS-Medium, $V_R = 100$ mL, $I = 350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$), Säule: RP30 (5 μm , 250*4mm) $25^\circ C$; Peakidentifizierung s. Tabelle 20

Tabelle 20 : Pigmentzusammensetzung im *S. rubescens*-Extrakt nach LC-MS-Analyse (n=3)

Peak Nr.	t_r	m/z	Verbindung	Anteil (%)
1	17,9	597,3	Astaxanthin	15,0
2	19,5	565,3	Adonixanthin	17,1
3	21,4	551,3	Lutein	10,0
4	22,4	569,3	Zeaxanthin	1,0
5	23,3	581,3	Adonirubin	1,8
6	27,1	565,3	Canthaxanthin	20,1
7	29,3	565,3	Z-Canthaxanthin	2,6
8	32,4	906,6 [M]	Chlorophyll b	1,0
9	33,8	892,6 [M] / 843,7	Chlorophyll a/ Adonix-C18:3	0,4/ 0,4
10	36,4	855,7 / 845,7	Ax-C18:4 / Adonix-C18:2	0,5/ 0,4
11	37,7	551,3	Echinenon	0,3
12	38,2	857,7 / 831,7	AxC18:3/ Lut-C18:2	2,3/ 0,8
13	39,7	859,7 833,7	Ax-C18:2/ Lut-C18:1	1,9/ 0,7
14	41,5	861,7	Ax-C18:1	8,1
15	42,5	863,7	Ax-C18:0	6,6
16	44,9	847,7	Adonix-C18:1	1,7
17	46,0	849,7	Adonix-C18:0	0,5
18	46,5	887,7	Ax-20:2	0,7
19	47,8	537,3/ 891,7	β -Carotin/ Ax-20:0	2,8/ 0,4
20	48,4	1121,8 / 859,8	Ax-C18:2/C18:2	0,3
21	49,6	1123,8 / 859,8	Ax-C18:2/C18:1	0,3
22	50,2	1125,8 / 861,8	Ax-C18:1/C18:1	0,8
23	51,2	1127,8 / 861,8	Ax-C18:1/C18:0	1,1
24	52,6	1129,8 / 863,8	Ax-C18:0/C18:0	0,4

Es wurden darüber hinaus auch zwei Luteinmonoester (Lutein-Linolenat und Lutein-Oleat) detektiert, die mit jeweils einem Ax-ME koeluierten. Darüber konnten Adonixanthinester identifiziert werden, Adonirubinester wurden hingegen nicht nachgewiesen.

Das Adonixanthin, welches in höheren Gehalten vorkam als Ax, war mit Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure verestert, der Anteil an der Monoesterfraktion betrug jedoch nur 3%. Das quasimolekulare Ion der Carotinoiddiester wurde auch in *S. rubescens* wie in *H. pluvialis* nur in geringen Signalintensitäten gemessen. Insgesamt wurden acht freie Carotinoide, 13 Monoester und fünf Diester detektiert. Die Hauptkomponenten im Monoesteranteil waren Ax-Oleat (32,4%) und Ax-Stearat (26,4%).

3.4 Physiologie der Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* und *S. rubescens* unter Stress

3.4.1 Wachstum und SC-Gehalte in *H. pluvialis* und *S. rubescens*

Das Wachstum in Form des Anstieges der Biomassekonzentration während der Kultivierung unter physiologischen Laborbedingungen unterschied sich zwischen *H. pluvialis* und *S. rubescens* ebenso deutlich wie die zeitabhängige Akkumulation von SC bei Stressexposition (Abbildung 27, S. 56).

Die volumetrische Biomasse-Produktivität von *S. rubescens* betrug $0,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und lag damit 3,4mal höher als die von *H. pluvialis* ($0,09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Während *S. rubescens* die stationäre Wachstumsphase bereits nach 14 Tagen erreicht hatte, war eine Biomassezunahme in der Kultur von *H. pluvialis* bis zum 18. Tag zu verzeichnen. Die Absterbephase trat bei *H. pluvialis* erst nach 34 Tagen ein, wohingegen ein Rückgang der Biomassekonzentration in *S. rubescens* bereits nach 18 Tagen gemessen wurde. Während der Kultivierung unter Stressbedingungen begann die Akkumulierung der SC in *H. pluvialis* nach 1,5 d (s. Abbildung 27), wohingegen die SC in *S. rubescens* erst nach vier Tagen messbar waren. Es folgte eine kontinuierliche Zunahme des SC-Gehaltes in *S. rubescens* bis zum Maximum von $5,6 \pm 0,45 \text{ mg/ g TS}$, zwischen Tag 27 und 46 reduzierte sich der Gehalt jedoch um das 3-Fache. Die Akkumulation der SC in *H. pluvialis* hingegen zeigte auch nach 46 Tagen noch keinen Rückgang, der SC-Gehalt lag bei Abbruch des Experimentes mit $16,1 \pm 0,22 \text{ mg/ g TS}$ 3mal höher.

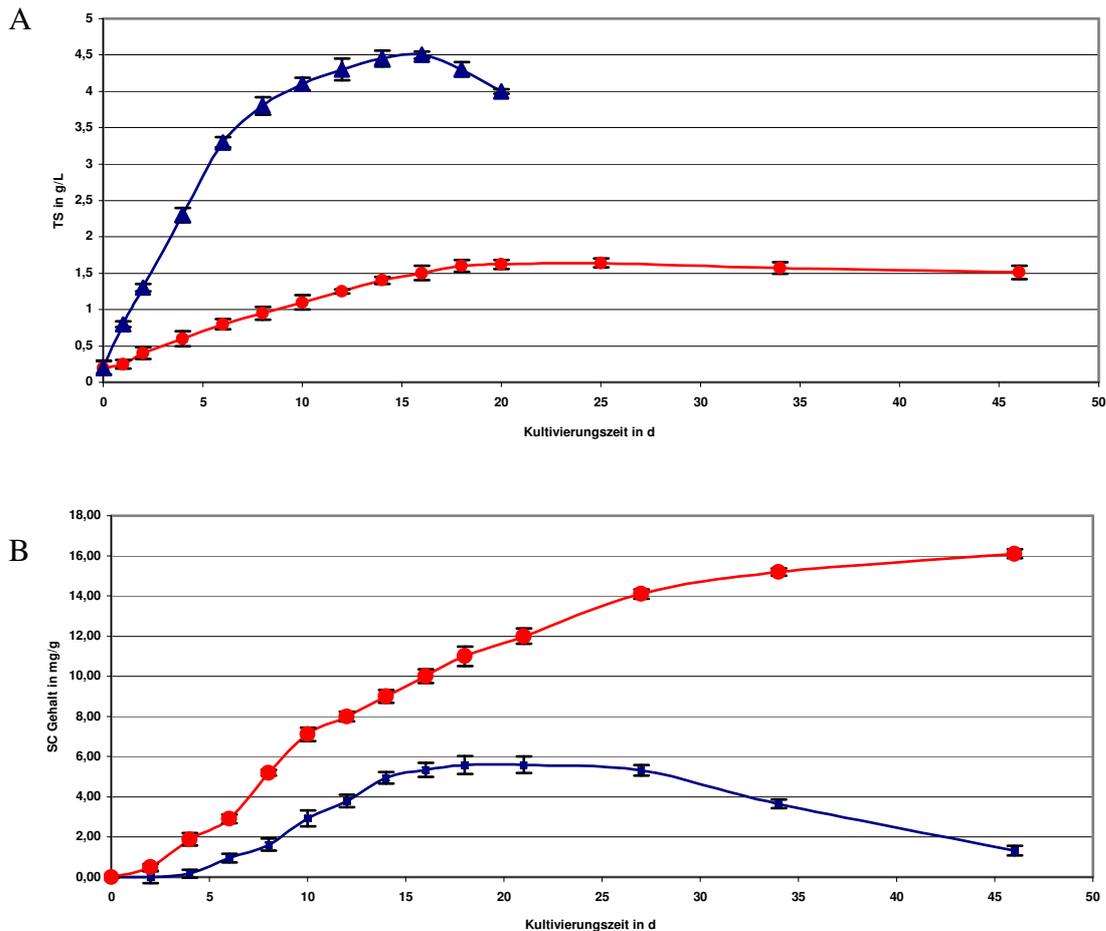


Abbildung 27: A: Zunahme der Biomassekonzentration während der Kultivierung von *H. pluvialis* (●, PET-Medium) und *S. rubescens* (■, Setlik-Medium), $V_R = 2\text{ L}$, $I = 70\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm, 2% CO_2 (v/v), $n = 9$

B: Verlauf der SC-Bildung während der Stressexposition in *H. pluvialis* (●, PET-Stress-Medium) und *S. rubescens* (■, Setlik-Stress-Medium), $V_R = 2\text{ L}$, $I = 350\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm, 2% CO_2 (v/v), $n = 9$

Die mikroskopische Untersuchung während der Stressexposition von *S. rubescens* zeigte die morphologischen Veränderungen in den Algenzellen (Abbildung 28).

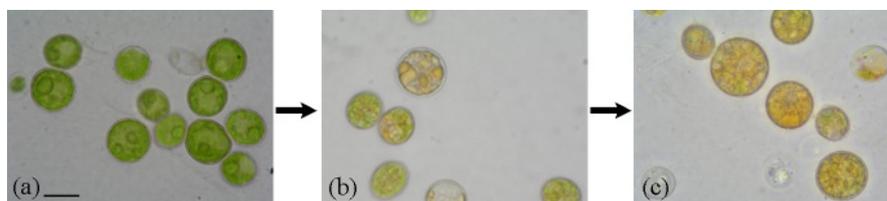


Abbildung 28: Mikroskopische Abbildung von *S. rubescens* während der Stressexposition, (a) physiologische Kultivierungsbedingungen, (b) nach 5 Tagen Stressexposition, (c) nach 14 Tagen Stressexposition; Vergrößerung: 1000-fach, Maßstab: 5 μm

S. rubescens ist unter physiologischen Bedingungen coccal (unbegeißelt) und ca. 5 μm im Durchmesser. Nach 5 Tagen Stressexposition war die Entwicklung von Lipidglobuli im Cytoplasma zu beobachten. Sie entwickelten sich ebenfalls an der Peripherie der Zelle, außerhalb des

Chloroplasten, und bildeten nach Versuchsende einen geschlossenen Film. Gleichzeitig stieg der Zelldurchmesser auf $10,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ an. Abgesehen von den fehlenden Flagellen zeigen die Veränderungen in der Morphologie der Zellen deutliche Parallelen zu denen in *H. pluvialis*.

3.4.2 Medien-abhängige Veränderung der Pigmentzusammensetzung in *H. pluvialis*

Um die Fragestellung zu beantworten, ob verschiedene Medienzusammensetzungen Einfluss auf die Carotinoidzusammensetzung, -gehalte sowie die Biomasseausbeute haben, wurde die Carotinoidakkumulations-Charakteristik in drei Mangelmedien (OHM-, BBM- und PET-Stress) über einen Zeitraum von 46 Tagen untersucht. Die Ax-Biosynthese wurde in einer definierten Zellkonzentration vegetativer Zellen von *H. pluvialis* durch die Anwendung von gesteigerten Lichtintensitäten ($350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Nitrat- und Phosphatmangel induziert. Der zeitabhängige Verlauf der Biomassekonzentration, Chlorophyll- und Carotinoidgehalte in allen drei Medien ist beispielhaft für das PET-Medium in Abbildung 29 dargestellt.

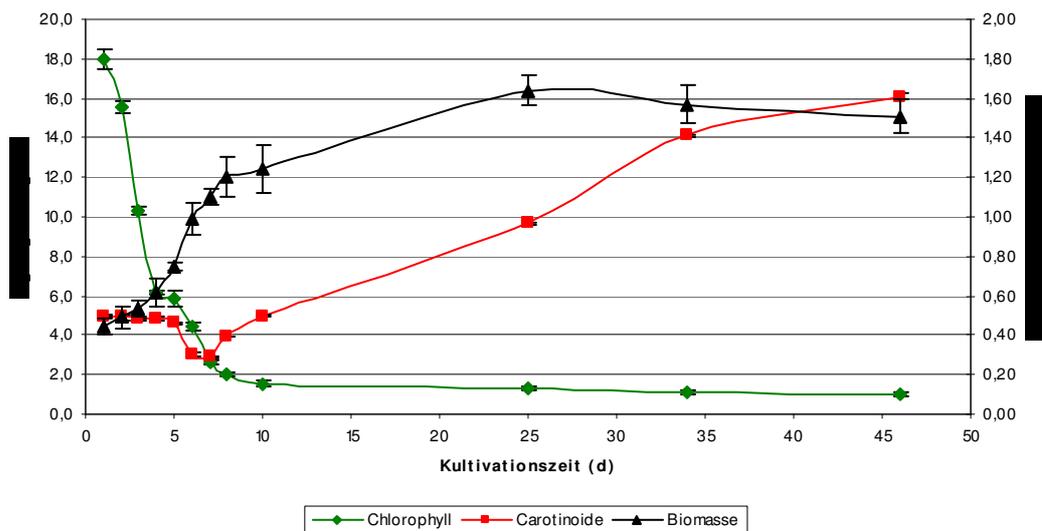


Abbildung 29 : Veränderung der Biomassekonzentration, des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit in *H. pluvialis* (Bedingungen: PET-Medium, $V_R = 2\text{L}$, $I = 350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n = 9$)

Ein Farbumschlag der Kulturen konnte in allen drei Medien bereits nach 3 Tagen ins Bräunliche und nach 5 Tagen ins Rote beobachtet werden. Zu Beginn der Mangelsituation betrug das Verhältnis von Chlorophyll a zu Carotinoiden 2,4. Innerhalb der ersten 10 Tage konnte eine sehr schnelle Abnahme der Chlorophyllgehalte auf 9% des ursprünglichen Wertes beobachtet werden. Der Carotinoidgehalt nahm in den ersten fünf Tagen der Kultivierung nur sehr langsam ab, in den nächsten zwei Tagen wurde jedoch eine Abnahme um 45% auf $2,9 \pm 0,12 \text{ mg/g TS}$ gemessen. Von diesem Zeitpunkt an stieg die Carotinoidkonzentration konstant bis zum Versuchsende

hin an, ohne dabei nach 46 Tagen einen stationären Wert zu erreichen. Aufgrund der Absterbephase der Alge wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt abgebrochen.

In den drei untersuchten Medien wurde im OHM die höchste (2,15 g/ L TS), im BBM und im PET geringere Biomasseendkonzentrationen gemessen (1,95 bzw. 1,51 g/ L TS). Die hieraus resultierenden volumenbezogenen Produktivitäten liegen zwischen 23 und 32 mg*L⁻¹*d⁻¹. Das Wachstum verhielt sich bis zum achten Kultivierungstag sehr ähnlich, danach war die Biomassezunahme im BBM- und PET-Stress wesentlich geringer. Am neunten Tag war die Biomassekonzentration im OHM bereits 23% höher als im PET-Medium, eine Entwicklung, die bis zum Ende des Versuches (46 Tage) anhielt. Zu diesem Zeitpunkt war die gemessene Biomassekonzentration im OHM 43% höher als im PET. Auffällig ist, dass das Erreichen der stationären Phase abhängig vom Medium erfolgte. Im PET-Medium wurde die höchste TS-Konzentration nach 27 Tagen, im BBM nach 32 und im OHM nach 34 Tagen gemessen. Je eher die stationäre Phase erreicht wurde, desto geringer war die Biomassekonzentration am Ende des Versuches.

Die Analyse der Algenbiomasse zu Versuchsbeginn ergab einen durchschnittlichen Chlorophyllgehalt von 2,4±0,11% und einen Primärcarotinoidgehalt von 0,48±0,03%. Die Carotinoid- und Chlorophyllgehalte nach Abschluss des Versuches sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 21 : Biomassekonzentration und Pigmentgehalte in *H. pluvialis* in drei Nitratmangelmedien nach 46 Tagen Kultivierung (Bedingungen während der Stressexposition: I=350 µE*m⁻²*s⁻¹, 25°C, n=9)

	Medium		
	OHM	BBM	PET
Biomassekonzentration (g/ L)	2,15±0,07	1,95±0,04	1,51±0,09
Chlorophyllgehalt (mg/ g TS)	0,00±0	0,2±0,01	1,0±0,01
Gesamtcarotinoidgehalt (mg/ g TS)	9,0±0,02	12,1±0,03	16,1±0,04
Carotinoidkonzentration (mg/ L)	19,26±0,15	21,76±0,20	24,31±0,13
Ax-Gehalt (mg/ g TS)	7,28±0,1	9,5±0,15	13,3±0,08

Mit 16,1 mg SC/ g TS wurde die höchste Ausbeute an sekundären Carotinoiden im PET-Medium gemessen, 1,8mal mehr im Vergleich zum OHM (9 mg/ g TS), welches die geringste Konzentration an Carotinoiden enthielt. Obwohl die erzielte Biomassekonzentration im PET-Medium am niedrigsten war, wurde hier die höchste Carotinoidausbeute gemessen (sowohl biomassebezogen mit 16,1 mg/ g TS als auch bezogen auf das Kulturvolumen mit 24,3 mg/ L). Die höhere Zelldichte in BBM und OHM konnte die geringeren Carotinoidgehalte der Biomassen nicht kompensieren. Daher lässt sich schlussfolgern, dass unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen das PET-Medium für die Carotinoidproduktion am besten geeignet ist.

Der Ax-Gehalt (Summe aus freiem und veresterten Ax) schwankte statistisch nicht signifikant (P = 0,131) zwischen 86% (BBM) und 89% (OHM) des Gesamtcarotinoidgehaltes. Maximal wurden im PET-Medium 13,3±0,08 mg/ g TS Ax erhalten.

Die Veränderung der Carotinoidzusammensetzung während der Kultivierung bzw. der Einfluss der verschiedenen Medien auf die Carotinoidzusammensetzung in *H. pluvialis* sind in Abbildung 30 dargestellt. Die auftretenden Pigmente (insgesamt bis zu 31 Einzelverbindungen vgl. Abbildung 23, S. 50) wurden hierfür aus Gründen der Übersichtlichkeit in Gruppen zusammengefasst: 1. primäre Carotinoide mit ähnlicher Polarität (Violaxanthin und Neoxanthin), 2. Lutein, 3. β -Carotin, 4. sekundäre Carotinoide (Ax, Adonixanthin, Adonirubin, Cx), 5. Carotinoidmonoester (ME) und 6. Ax-DE.

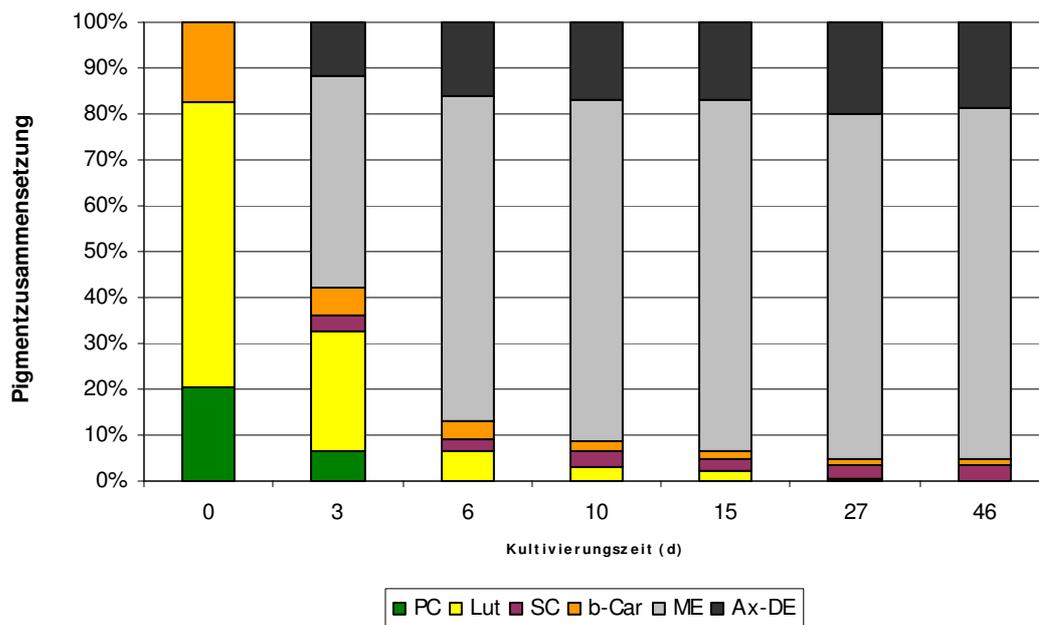


Abbildung 30: Veränderung der Zusammensetzung der Carotinoide in *H. pluvialis* in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: PET-Medium, VR = 2L, $I=350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$, 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), n=9)

Nachdem *H. pluvialis* dem Nährstoffmangel und der gesteigerten Lichtintensität ausgesetzt wurde, konnte die Ax-Biosynthese in Abhängigkeit vom Medium sehr schnell detektiert werden (nach ein bis zwei Tagen). Die Zusammensetzung der Carotinoide in *H. pluvialis* in den drei verwendeten Medien zeigte die signifikantesten Unterschiede in den ersten Kultivierungstagen. Der schnellste Anstieg der Carotinoidgehalte wurde im PET-Medium erzielt, nach drei Tagen bestanden bereits 61,5% der detektierten Carotinoide aus freien SC bzw. ME und DE, der Anteil der primären Carotinoide ist dementsprechend auf 38,5% der Ursprungswerte reduziert. Nach sechs Tagen betrug der Anteil an Carotinoidmono- und -diestern bereits 86,5%. In BBM und OHM konnte der gleiche Verlauf beobachtet werden, nur zeitlich verzögert im Vergleich zum PET-Medium. In diesen beiden Medien war ein höherer Prozentsatz an freien Carotinoiden enthalten (Bsp. Tag 6: 8,1% SC in OHM und 5,1% in BBM, in PET nur 2,5%). Im OHM, dem Medium, in dem das höchste BM-Wachstum zu verzeichnen war, nahmen die Lutein- und Chloro-

phyllgehalte am langsamsten ab. Lutein war hier wie auch im BB-Medium noch bis zum 27. Tag messbar, im PET-Medium war es bereits nach 15 Tagen nicht mehr nachweisbar. Nach sechs Tagen war der Anteil an ME und DE mit 28,5% bzw. 61,5% signifikant geringer ($P = 0,0012$) als im PET-Medium (81,4%).

Wichtig ist bei der Beobachtung der zeitabhängigen Carotinoidakkumulation herauszustellen, dass die sekundären Carotinoide simultan mit ihren Fettsäureestern detektiert wurden. Nach 46 Tagen Kultivierungszeit in den Nitratmangelmedien waren keine PC mehr detektierbar, die Chlorophylle waren vollständig abgebaut und es waren im Durchschnitt 7% freie Carotinoide, 74% Carotinoidmonoester und 19% Carotinoiddiester im Carotinoidprofil von *H. pluvialis* enthalten. Das Verhältnis zwischen ME und DE, die während der Stressexposition synthetisiert wurden, schwankte abhängig vom Medium im Bereich 3,6 bis 6,7. Im PET-Medium war das Verhältnis während der Kultivierung relativ konstant (im Durchschnitt $3,97 \pm 0,21$), wohingegen im BB-Medium das Verhältnis zu Beginn 1,8mal höher ist ($6,7 \pm 0,19$), aber während der Kultivierung konstant bis zum Ende auf 3,39 abnahm.

Die Analyse des Pigmentprofils in *H. pluvialis*, welcher in verschiedenen Medien kultiviert wurde, deutet klar darauf hin, dass das verwendete Kultivierungsmedium einen erheblichen Einfluss sowohl auf die Carotinoidkonzentration als auch auf das Verhältnis der Ax-ME und -DE hatte. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der LC-MS-Analyse lässt sich feststellen, dass der Einfluss auf das Carotinoidprofil durch die verwendeten autotrophen Medien nur quantitativer Natur war. Die identifizierten Verbindungen in den drei Extrakten waren identisch.

3.4.3 Veränderung der Pigmentzusammensetzung in *S. rubescens*

Die Veränderung der Biomassekonzentration, des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes während der Stressexposition (Starklicht, Nährstoffmangel und 69 mM NaCl) in *S. rubescens* ist in Abbildung 31 dargestellt. Die BM-Konzentration stieg innerhalb von 14 Tagen von 0,4 g/L auf 1,4 g/L an, was bis zum 12. Tag einer volumetrischen BM-Produktivität von $83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ entsprach. Die stationäre Wachstumsphase wurde nach 14 Tagen erreicht, nach 18 Tagen setzte die Absterbephase ein. Die Farbe der Kultur veränderte sich von Grün (1.-4. Tag) über Braun (5.-7. Tag) zu einem kräftigen Orange (7.-27. Tag). Der Chlorophyllgehalt reduzierte sich sehr stark in den ersten fünf Tagen des Versuches (auf 25% des Ausgangswertes von 22,5 mg/g TS) und nahm dann kontinuierlich bis zum Endes des Experimentes ab. Der Gesamtcarotinoidgehalt reduzierte bis zum sechsten Tag, stieg danach jedoch wieder an und erreichte nach 18 Tagen ein Maximum bei $5,6 \pm 0,45 \text{ mg/g TS}$. Dieser Wert blieb bis zum 24. Tag konstant. Danach reduzierte sich der Carotinoidgehalt zusammen mit der Biomassekonzentration.

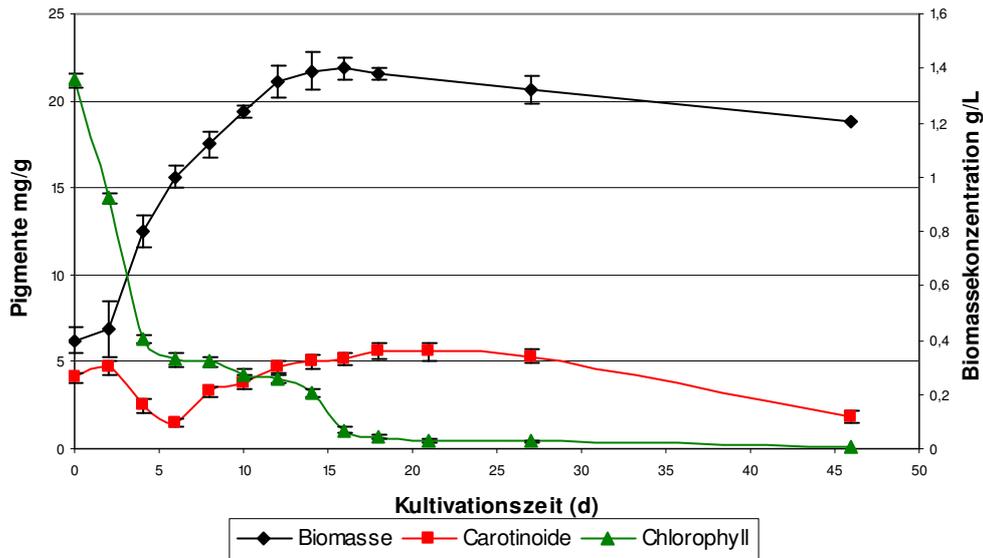


Abbildung 31 : Veränderung der Biomassekonzentration, des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit in *S. rubescens* (Bedingungen: SS-Medium, $V_R = 2L$, $I=350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$, 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n = 6$)

Die Veränderung der Pigmentzusammensetzung wurde mittels HPLC untersucht, das resultierende Chromatogramm des grünen bzw. des orangen Algenextraktes ist in Abbildung 32 dargestellt.

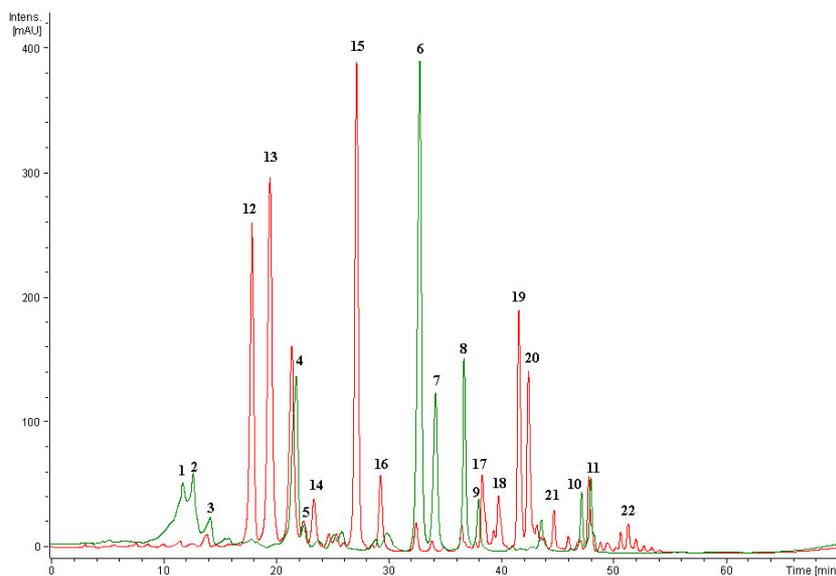


Abbildung 32 : HPLC-Chromatogramm der Pigmente in *S. rubescens* vor (grün) und nach (rot) der Stressexposition; Peakidentifizierung: 1 - Violaxanthin, 2 - Neoxanthin, 3 - Luteoxanthin, 4 - Lutein, 5 - Zeaxanthin, 6 - Chlorophyll b, 7 - Phaeophytin b, 8 - Chlorophyll a, 9 - Phaeophytin a, 10 - α -Carotin, 11 - β -Carotin, 12 - Ax, 13 - Adonixanthin, 14 - Adonirubin, 15 - Cx, 16 - Z-Cx, 17 - Ax-C18:3/ Lut-C18:2, 18 - Ax-C18:2/ Lut-18:1, 19 - Ax-C18:1, 20 - Ax-C18:0, 21 - Adonix-C18:1, 22 - Ax-C18:1/C18:0

Um die Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung unter den Starklicht- und Nährstoffmangelbedingungen genauer beschreiben zu können, wurden die Biomassen in einem Zeitraum von 46 Tagen regelmäßig auf ihre Carotinoidzusammensetzung hin untersucht. Das Ergebnis ist

in Abbildung 33 dargestellt. Hierbei entspricht ein Balken der durch LC-MS bestimmten Carotinoidzusammensetzung am entsprechenden Kultivierungstag. Die Gruppierung der Carotinoide erfolgte analog zur Darstellung von *H. pluvialis*, wie folgt: 1. polare primäre Carotinoide (Neoxanthin/ Violaxanthin/ Luteoxanthin), 2. Lutein/ Zeaxanthin 3. β -Carotin, 4. freies Ax, 5. Adonixanthin, 6. Cx, 7. Carotinoidmonoester und 8. Ax-DE.

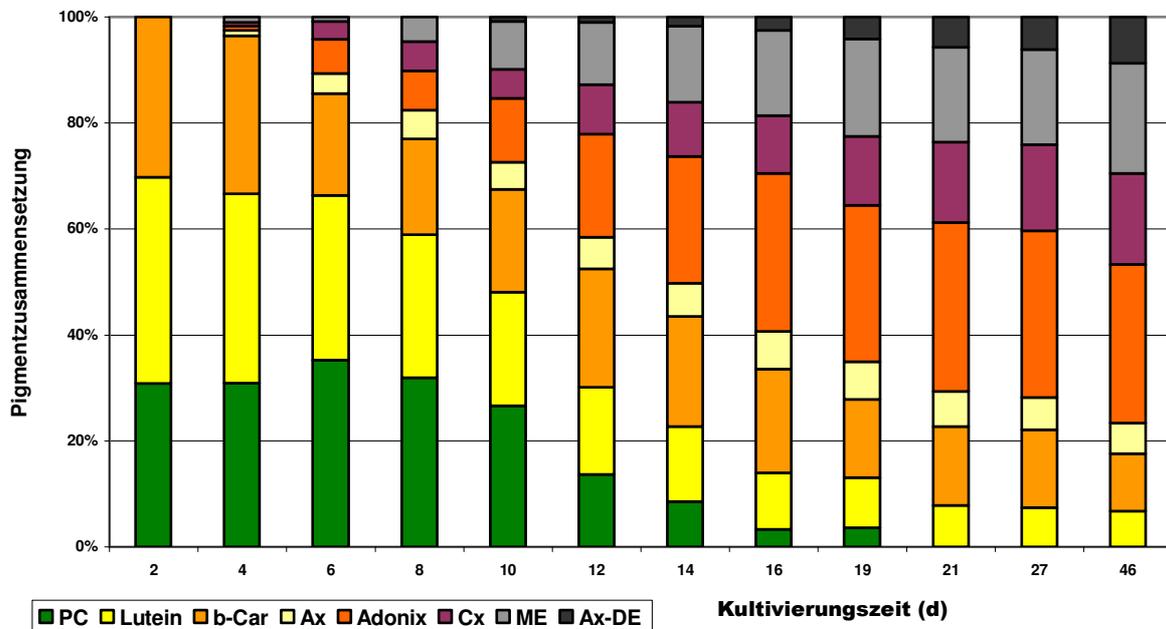


Abbildung 33 : Veränderung der Zusammensetzung der Carotinoide in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 2L$, $I = 350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$, $3,3 vvm$ Luft + $2\% CO_2 (v/v)$, $n=6$)

Zu Beginn der Stressexposition wurden nur die für die Chlorophyta typischen photosynthetisch aktiven Pigmente Chlorophyll a und b, Lutein, Zeaxanthin, β -Carotin, Neoxanthin, Violaxanthin und Luteoxanthin gemessen. Es wurden keine sekundären Carotinoide detektiert. Am 4. Tag der Stressexposition wurden erstmalig die Ketocarotinoide Ax, Adonixanthin, Cx und Adonirubin nachgewiesen, gleichzeitig wurden Carotinoidmonoester von Lutein und Ax detektiert. Bis zum 21. Tag erhöhte sich der Anteil an freien sekundären Carotinoiden auf 55,9%, der Mono- und Diesteranteil der Carotinoide lag bei 17,6% bzw. 5,6%. Bei fortschreitender Kultivierungsdauer erhöhte sich der Anteil der Carotinoidmono- und -diester stetig auf 20,5% bzw. 8,6% bei Versuchsende. Adonixanthin bildete mit 31,3% den größten Anteil an freien Carotinoiden. Die Gehalte der polaren primären Carotinoide (Violaxanthin, Neoxanthin, Luteoxanthin) nahmen ab dem 6. Kulturtag kontinuierlich ab und lagen ab dem Tag 21 unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu blieben sowohl β -Carotin als auch Lutein bis zum Versuchsende nach 46 Tagen mit 10,7 bzw. 6,6% im Carotinoidspektrum enthalten.

Der Nitratmangel führte zu einem charakteristischen Rückgang der Chlorophylle a und b, jedoch wurde bis zum Ende der Kultivierung kein vollständiger Abbau beobachtet.

3.5 Steigerung der Astaxanthin-Ausbeute

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss unterschiedlicher Stressbedingungen auf die SC-Gehalte und -zusammensetzung unter dem Aspekt der Steigerung der Ax-Ausbeute nach 14-tägiger Kultivierung untersucht. Aufgrund der in der Gattung *Scenedesmus* vergleichsweise hohen Ausbeuten an Ax und Cx wurden die Versuche zur Ausbeutesteigerung mit *S. rubescens* durchgeführt. Um einen Vergleich der Ergebnisse innerhalb der Gattung *Scenedesmus* zu ermöglichen erfolgte die Kultivierung mit BS-Vorstufen zusätzlich mit *S. producto capitatus*.

3.5.1 Lichtquantität und -qualität

Die Lichtintensität ist ein Schlüsselfaktor in der Induktion der Ax-Biosynthese. Aus diesem Grund wurde zunächst die Lichtintensität während der Kultivierungszeit in neun Stufen durch den Abstand zum Photobioreaktor erhöht. Das Ergebnis der Carotinoidgehalte und -zusammensetzung in der Biomasse ist Abbildung 34 zu entnehmen.

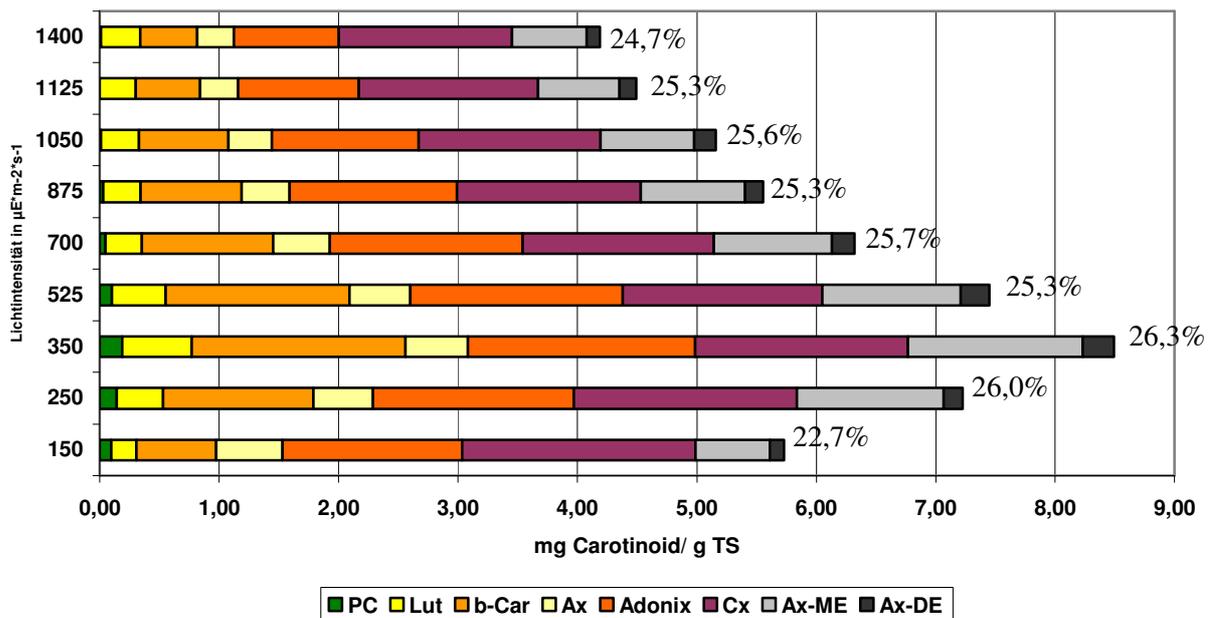


Abbildung 34 : Carotinoidgehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach 14 Tagen Kultivierungszeit, Prozentangabe entspricht dem Ax-Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt (Summe aus freiem Ax, Ax-ME und Ax-DE), (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 100 \text{ mL}$, 25°C , $3,3 \text{ vvm}$ Luft + $2\% \text{ CO}_2 \text{ (v/v)}$, $n=6$)

Mit steigenden Lichtintensitäten nahm der Carotinoidgehalt von $5,76 \pm 0,21 \text{ mg/ g TS}$ ($150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auf einen Maximalwert von $8,62 \pm 0,3 \text{ mg/ g TS}$ bei $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ signifikant zu ($P = 0,0012$). Der Ax-Gehalt (Summe aus freiem und unveresterten Ax) stieg bei dieser Erhöhung von $1,33 \pm 0,1 \text{ mg/ g TS}$ auf $2,32 \pm 0,43 \text{ mg/ g TS}$ ebenfalls signifikant an ($P = 0,0037$). Beim Überschreiten dieser Intensität wurde jedoch eine sukzessive Abnahme der Carotinoidgehalte gemessen.

sen, bei einer Lichtintensität von $1400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ betrug der Gesamtcarotinoidgehalt nur noch 79,9% des Ausgangswertes ($110 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Der statistische Vergleich der Differenzen zwischen dem Ax-Gehalt und dem Gesamtcarotinoidgehalt ergab, dass diese nicht signifikant voneinander abwichen ($P = 0,008$). Die Erhöhung der Lichtintensität beeinflusste also die Quantität der gebildeten Carotinoide, hatte jedoch keinen positiven Einfluss auf den Ax-Gehalt.

Um den Einfluss des Mediums beschreiben zu können, wurde dieses Experiment in destilliertem Wasser als Medium wiederholt. Dieser Versuch ergab ebenfalls die höchsten Astxanthingehalte bei einer Lichtintensität von $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (s. Anhang F), die jedoch mit $7,2\pm 0,22 \text{ mg/ g TS}$ unter denen des SS-Mediums lagen ($P < 0,0001$).

Der Zusammenhang zwischen Lichtintensität und SC-Gehalt in der Grünalge wurde ebenfalls durch den Einsatz von Blasensäulen mit steigenden Durchmessern beobachtet (Tabelle 22), in die bei gleicher Lichtintensität weniger Photonen eingetragen werden.

Tabelle 22 : Einfluss des Reaktordurchmessers auf den Carotinoidgehalt in *S. rubescens*, (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $I = 250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 25°C , $3,3 \text{ vvm} + 2\% \text{ CO}_2$ (v/v), $n=6$)

	3 cm ($V_R=100 \text{ mL}$)	5 cm ($V_R=500 \text{ mL}$)	8 cm ($V_R= 2 \text{ L}$)	P (ANOVA)
\sum freie Carotinoide (mg/ g TS)	$6,02\pm 0,17$	$3,77\pm 0,34$	$3,42\pm 0,34$	$< 0,0001$
\sum veresterte Carotinoide (mg/ g TS)	$1,41\pm 0,31$	$2,08\pm 0,26$	$1,05\pm 0,12$	0,0117
\sum Ax (mg/ g TS)	$2,06\pm 0,15$	$2,38\pm 0,33$	$1,37\pm 0,2$	0,0285
Verhältnis freie/ veresterte Car	$0,81\pm 0,09$	$0,64\pm 0,07$	$0,77\pm 0,05$	0,0991
Verhältnis Ax/ Car_{ges}	$0,28\pm 0,1$	$0,41\pm 0,21$	$0,31\pm 0,12$	0,1129
\sum Carotinoide (mg/ g TS)	$7,43\pm 0,23$	$5,85\pm 0,23$	$4,47\pm 0,16$	0,0098

Je höher der Durchmesser des Photobioreaktors war, desto geringer war die Ausbeute an SC unter sonst identischen Kultivierungsbedingungen. Diese signifikante Abnahme des Gesamtcarotinoidgehaltes ($P = 0,0098$) erfolgte mit der Zunahme des Reaktordurchmessers (und damit des Lichtweges) um das 1,7- bzw. das 2,7-Fache, die Gesamtcarotinoidgehalte sanken um $20,9\pm 3,1\%$ bzw. um $40\pm 2,2\%$ im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser des PBRs (3 cm). Sowohl das Verhältnis zwischen veresterten und freien Carotinoiden, als auch zwischen dem Ax- und dem Gesamtcarotinoidgehalt schwankte deutlich, jedoch nicht signifikant ($P = 0,0991$ bzw. $P = 0,1129$).

Da die Zusammensetzung der emittierten Wellenlänge des Lichtes, welches für die Kultivierungszeit von 14 Tagen die *S. rubescens* Kulturen kontinuierlich bestrahlte, einen wichtigen Einfluss auf die Carotinoidgehalte haben kann, wurde die Lichtquelle ausgehend von der Lichtfarbe „warm white“ variiert. Es kamen eine Blaulichtquelle ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) und eine UV-Lichtquelle ($\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$) zum Einsatz. Abbildung 35 zeigt die Zusammensetzung des Carotinoidspektrums sowie die SC-Gehalte in der Biomasse (TS) nach 14 Tagen Kultivierungszeit. Der höchste

Carotinoidgehalt ($6,78 \pm 0,16$ mg/ g TS) wurde bei der Bestrahlung der Algenkulturen mit UV-Lichtanteil erzielt, gefolgt vom Carotinoidgehalt der Kulturen, die mit der Lichtquelle mit Blau-lichtanteil kultiviert wurden. Diese Zunahme entsprach einer signifikanten Steigerung des Carotinoidgehaltes von 35,9% unter UV-Licht ($P < 0,0001$). Es war auch ein schnellerer Farbumschlag der Kulturen zu erkennen, die mit Blau- und UV-Licht bestrahlt wurden.

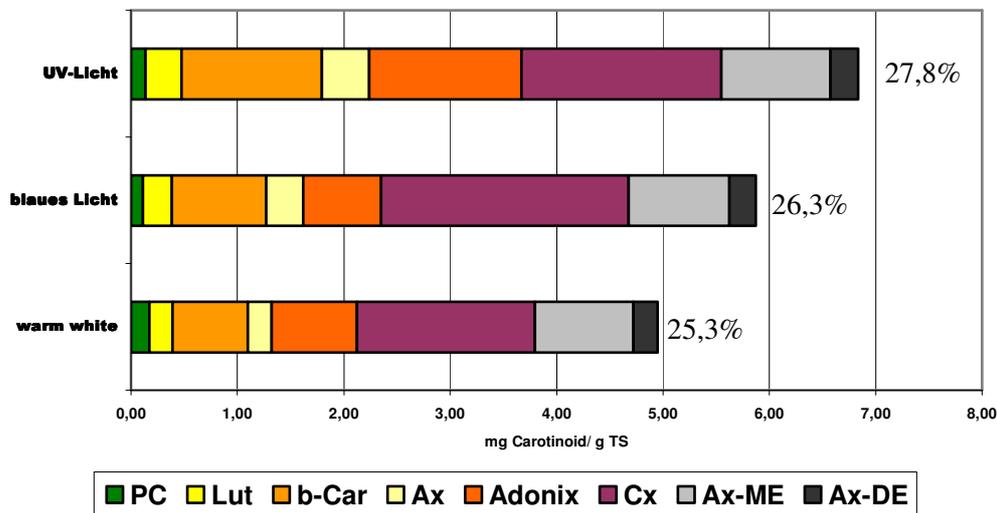


Abbildung 35 : Carotinoidgehalt (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Lichtzusammensetzung nach 14 Tagen Kultivierungszeit, Prozentangabe entspricht dem Ax-Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt (Summe aus freiem Ax, Ax-ME und Ax-DE), Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 2$ L, $350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, $25^\circ C$, 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n=6$

Der Ax-Gehalt stieg von $1,37 \pm 0,2$ mg/ g TS (Kontrolle) auf $1,73 \pm 0,31$ mg/ g TS (UV-Licht) an, die Zunahme war im Vergleich zum Gesamtcarotinoidgehalt jedoch nicht signifikant ($P = 0,0011$).

Tabelle 23 : Einfluss der Wellenlänge auf die Carotinoidgehalte (mg/ g TS) und die Carotinoidekonzentrationen (mg/ L) in *S. rubescens*

	weißes Licht	blaues Licht	UV-Licht	P (ANOVA)
Gesamtcarotinoidgehalt (mg/ g TS)	$4,99 \pm 0,15$	$5,85 \pm 0,13$	$6,78 \pm 0,16$	$< 0,0001$
Carotinoidekonzentration (mg/ L)	$0,38 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$	0,0098

Die Carotinoidekonzentration nahm bei energiereicherer Strahlung trotz signifikant gesteigerter Carotinoidgehalte von $0,38$ mg/ L auf $0,29$ mg/ L statistisch signifikant ab ($P = 0,0098$), eine Beobachtung, die mit geringeren Biomassekonzentrationen korrelierte.

3.5.2 Salzeinfluss

Nach der Auswahl der geeigneten Lichtintensität wurde der Einfluss einzelner Salzkomponenten auf die Ax-Gehalte in *S. rubescens* untersucht. Hierbei sollte vor der Zugabe von NaCl geklärt werden, ob Phosphat- oder Nitratmangel den größeren Effekt auf die SC-Produktion haben bzw. inwieweit die Kombination dieser Stressfaktoren die Ax-Bildung verstärkt. Das Mineralmedium

für Chlorophyceen nach Setlik (1968) wurde durch die Zugabe von NaCl und KCl modifiziert (NaCl als zusätzlicher Stressfaktor und KCl für den isoosmotischen Ausgleich der Nährsalzkonzentration). Bei Instant Ocean handelt es sich um ein künstliches Meersalzmedium (569 mM) ohne Nitrat und Phosphatquelle. Abbildung 36 zeigt sowohl die Zusammensetzung als auch die Gehalte der einzelnen Carotinoide in *S. rubescens* nach 14 Tagen Kultivierungszeit.

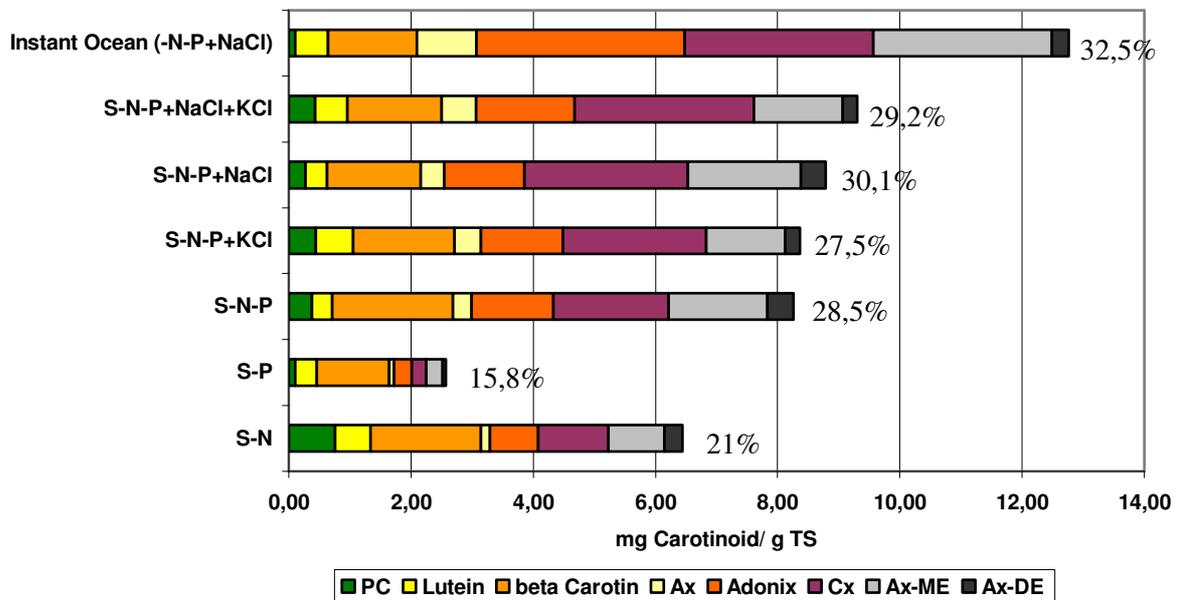


Abbildung 36 : Carotinoidgehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von Nitrat- und Phosphatmangel sowie NaCl- (69 mM) und KCl- (19 mM) Einfluss nach 14 Tagen Kultivierungszeit; S = Setlik-Medium, -N = Nitratmangel, -P = Phosphatmangel, Instant Ocean: künstliches Meersalz (-N, -P, 569 mM NaCl), Prozentangabe entspricht dem Ax-Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt (Summe aus freiem Ax, Ax-ME und Ax-DE), Bedingungen während der Stressexposition: $V_R = 100 \text{ mL}$, $I = 350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), n=6

In diesem Experiment zeigten sich deutliche Unterschiede sowohl im prozentualen Ax-Anteil als auch im Gesamtcarotinoidgehalt der Kulturen. Wenn ausschließlich Nitratmangel oder ausschließlich Phosphatmangel im Medium vorlag, war der Ax-Anteil mit $21 \pm 1,8\%$ bzw. $15,9 \pm 2,3\%$ signifikant geringer als bei Nitrat- und Phosphatmangel ($28,5\%$, $P = 0,0057$ bzw. $P = 0,0009$). Durch den Zusatz von NaCl wurde der Ax-Gehalt geringfügig aber signifikant gesteigert: mit 69 mM NaCl auf $30,1 \pm 0,9\%$ ($P = 0,001$) und mit 569 mM NaCl auf $32,5 \pm 1,1\%$ ($P = 0,0074$). Der Zusatz von KCl ergab mit $27,5 \pm 3,6\%$ bzw. $29,2 \pm 2,7\%$ Ax-Anteil geringere Werte, diese Abweichungen war jedoch nicht signifikant ($P = 0,096$).

Unter Nitratmangel waren noch 48,18% primäre Carotinoide enthalten und der Car_{ges} lag bei $6,53 \pm 0,35 \text{ mg/ g TS}$. Bei normaler Nitratkonzentration und Phosphatmangel hingegen wurde ein deutlich reduzierter Carotinoidgehalt von $2,56 \pm 0,21 \text{ mg/ g TS}$ gemessen. Dieser lag 2,5mal niedriger als in der Nitratmangelkultur, nur 0,92 mg/ g der Carotinoide wurden als SC und ihre Ester identifiziert.

Wenn sowohl NO_3^- als auch PO_4^{3-} aus dem Medium entfernt wurden, stieg der Carotinoidgehalt auf $8,37 \pm 0,43$ mg/ g TS an ($P = 0,015$). Der isoosmotische Ausgleich des Ionenmangels in diesem Medium mit KCl ergab mit $8,47 \pm 0,29$ mg/ g TS keinen signifikanten Unterschied im Gehalt der Carotinoide im Vergleich zur Kultur ohne KCl ($P = 0,114$). Der Zusatz von 69 mM NaCl zu den Nitrat- und Phosphatmangelmedien (mit und ohne KCl) zeigte eine geringe, aber signifikante Steigerung des Carotinoidgehaltes um 6% auf $8,89 \pm 0,36$ mg/ g TS (ohne KCl, $P = 0,039$) bzw. um 11,1% auf $9,41 \pm 0,21$ mg/ g TS. Die Steigerung des Carotinoidgehaltes durch den Einsatz von KCl war auch in diesem Experiment nicht signifikant ($P = 0,187$). Das Mangelmedium ohne Nitrat und Phosphat mit 69 mM NaCl entspricht dem SS-Medium, welches in der Mehrzahl der Stressexperimente eingesetzt wurde. Das künstliche Meersalz-Medium (Instant Ocean, kein NO_3^- und kein PO_4^{3-}) wies mit 569 mM NaCl eine 8,3-fach höhere NaCl-Konzentration auf und erzielte eine Gesamtcarotinoideausbeute von $12,96 \pm 0,38$ mg/ g TS. ($P = 0,0002$). Dies entspricht dem höchsten Wert in allen Untersuchungen zur Ausbeutesteigerung, und liegt beim 2,9-Fachen des Ausgangsgehaltes ($4,47 \pm 0,16$ mg/ g TS). Der Paarvergleichstest ergab jedoch, dass die Zunahme der Ax-Gehalte nicht signifikant von der des Gesamtcarotinoidgehaltes abwich ($P = 0,0192$). Der Einfluss dieser Veränderung der Medienzusammensetzung auf die erzielten SC-Gehalte unter Schwachlichtbedingungen ($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ist in Anhang F dargestellt (Tabelle 36 S.140). Dieser Vergleich ergab, dass die erzielten SC-Gehalte unter Starklicht ($350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) signifikant höher waren ($P = < 0,0001$) als unter Schwachlicht. Für die Induktion der SC-Biosynthese unter Schwachlicht waren sowohl Nitrat- und Phosphatmangel als auch NaCl im Medium erforderlich. Unter Starklicht hingegen inhibierte das Vorhandensein von Nitrat und Phosphat die SC-Biosynthese.

3.5.3 Vorstufen der Carotinoid-Biosynthese

Um die Produktivität der Carotinoidbildung zu erhöhen, wurden verschiedene mögliche Vorstufen der Carotinoid-Biosynthese in ein Stressmedium (Setlik-Stress, SS) gegeben. Die Untersuchungen wurden vergleichend an *S. rubescens* und an *S. producto capitatus* durchgeführt, und die erzielten Gesamtcarotinoidgehalte und Ax sind in Abhängigkeit vom verwendeten Zusatz in Tabelle 24 zusammengefasst. Jeder der verwendeten Zusätze zeigte in wenigstens einer der untersuchten Grünalgen einen signifikant positiven Effekt auf die Ax-Biosynthese. Deutlich wird, dass das Verhältnis von Ax am Gesamtcarotinoidgehalt in beiden Mikroalgen bereits im Vergleichsmedium verschieden ist (*S. rubescens*: 0,28; *S. producto capitatus*: 0,14).

Die Kultivierung mit Pyruvat im Stressmedium steigerte in beiden untersuchten *Scenedesmus*-Spezies die Ax- und Carotinoideausbeuten. In *S. rubescens* stieg der Gesamtcarotinoidgehalt bei

45 mM Pyruvat nicht signifikant an, der Ax-Anteil erhöhte sich jedoch statistisch signifikant um $28,7 \pm 2,2\%$ (0,0043). In *S. producto capitatus* wurde bei derselben Pyruvatkonzentration eine signifikante Steigerung des Gesamtcarotinoidgehaltes um 13,6% ($P < 0,0001$) und ein Anstieg des Ax-Gehaltes um 48,1% ($P = 0,0032$) gemessen.

Tabelle 24 : Einfluss von Carotinoid-Biosynthesestufen auf den Gesamtcarotinoidgehalt bzw. den Ax-Gehalt in *S. rubescens* und *S. producto capitatus* nach 14 Tagen Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 100$ mL, $I = 110 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), 25°C, n=6)

Zusatz	Konz. mM	<i>S. rubescens</i>		<i>S. producto capitatus</i>	
		\sum Car mg/ g TS	\sum Ax mg/ g TS	\sum Car mg/ g TS	\sum Ax mg/ g TS
SS	-	4,47 ± 0,16	1,24 ± 0,13	5,37 ± 0,14	0,74 ± 0,09
Pyruvat	6	4,87 ± 0,69	1,35 ± 0,1	5,56 ± 0,23	1,07 ± 0,05
	12	5,54 ± 1,55	1,51 ± 0,14	5,95 ± 0,23	1,29 ± 0,17
	45	5,71 ± 1,24	1,74 ± 0,15	6,11 ± 0,12	1,54 ± 0,16
P (ANOVA)		0,18	0,0043	< 0,0001	0,0032
GAP	0,045	6,05 ± 0,56	1,58 ± 0,22	4,93 ± 0,43	0,61 ± 0,15
P (ANOVA)		0,002	0,009	0,0575	0,1287
Pyruvat + GAP	45/ 0,045	4,32 ± 0,17	1,09 ± 0,27	6,32 ± 0,13	1,13 ± 0,21
P (ANOVA)		0,3563	0,1589	0,0011	0,0049
Acetat	20	5,52 ± 0,31	1,77 ± 0,26	5,98 ± 0,15	0,91 ± 0,09
	30	8,54 ± 0,27	2,41 ± 0,19	6,92 ± 0,35	1,29 ± 0,14
	45	9,04 ± 0,19	2,74 ± 0,15	8,22 ± 0,26	1,66 ± 0,12
P (ANOVA)		0,001	< 0,0001	0,008	0,0082

Beim Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) unterschied sich der Effekt auf die Carotinoidgehalte der untersuchten Grünalgen. Während in *S. rubescens* der Ax-Gehalt durch GAP signifikant erhöht wurde (um 21,5% auf 1,58 mg/ g TS; $P = 0,009$), sank der Ax-Gehalt in *S. producto capitatus* um 27,6%, wenn auch nicht signifikant ($P = 0,1287$). Die Kombination von Pyruvat und GAP hob den positiven Effekt auf die Ax-Gehalte in *S. rubescens* auf, während in *S. producto capitatus* eine Steigerung des Ax-Gehaltes um $34,5 \pm 3,19\%$ erzielt wurde ($P = 0,049$). Die Verwendung von Acetat im Kulturmedium steigerte die Carotinoidausbeuten in beiden Mikroalgen signifikant, mit dem größten Effekt von allen verwendeten Zusätzen. 45 mM Acetat wurden für beide Grünalgen als optimale Konzentration ermittelt. In *S. rubescens* betrug die Steigerung des Ax-Gehaltes das 2,2-Fache vom Kontrollwert (2,74 mg/ g TS; $P < 0,0001$), in *S. producto capitatus* wurde ebenfalls 2,2mal mehr Ax gemessen (1,66 mg/ g TS; $P = 0,0082$). Die Steigerung der Acetatkonzentration auf 60 mM führte in beiden Mikroalgen zu einer Abnahme der Carotinoidgehalte. Die Zugabe der möglichen Biosynthesestufen bewirkte trotz einer Steigerung der Ax-Ausbeuten in sieben von acht Experimenten keine signifikante Veränderung des Ax-Anteils im Vergleich zum Gesamtcarotinoidgehalt (Ausnahme 45 mM Pyruvat in *S. rubescens*, $P = 0,101$).

4. Diskussion

4.1 Sekundärkarotinoidzusammensetzung der Mikroalgen im Screening nach Stressexposition

Die Fähigkeit einiger Grünalgen (Chlorophyta) unter bestimmten Umweltbedingungen Ax und andere SC zu synthetisieren wurde in der Literatur bereits früh beschrieben: für Vertreter der Ordnung Chlorococcales in den 60er Jahren (Dersch, 1960, Czygan, 1964, Czygan, 1968a), während Aufzeichnungen über *H. pluvialis* (Volvocales) bereits Anfang des vorigen Jahrhunderts gemacht wurden (Wollenweber, 1907). Es erfolgte jedoch häufig keine Identifizierung der Carotinoide und ihrer Derivate. Ausführlichere Untersuchungen zur Ax-Biosynthese beschäftigten sich fast ausschließlich mit der einzelligen Süßwasseralge *H. pluvialis*, der größte Teil der Chlorophyceae, die in Stammsammlungen erhältlich sind, wurden bislang nicht auf ihre SC-Akkumulationseigenschaften hin untersucht (Friedl, persönl. Mitteilung). Für die angestrebte biotechnologische Produktion von Ax wird gegenwärtig jedoch eine Mikroalge gesucht, welche die Probleme von *H. pluvialis*, die langsames Wachstum ($0,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Garcia-Malea et al., 2005)), geringe Zellzahlen und Kontaminationsprobleme (Joo und Lee, 2007) beinhaltet, überwindet.

Die Wahl der Mikroalgengattung als Ausgangspunkt für höhere Produktivitäten und für die Untersuchung der Ax-Biosynthese fiel auf *Scenedesmus* sp. (Chlorococcales), da diese sowohl in der Literatur (Tanaka et al., 1996, Hanagata und Dubinsky, 1999, Orosa et al., 2000) als auch in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Griehl die Fähigkeit zur Bildung von SC gezeigt hatte. Darüber hinaus ist diese Gattung vergleichsweise einfach zu kultivieren und wäre daher für eine Anwendung im großtechnischen Maßstab geeignet (de Morais und Costa, 2007). Neben dem Kriterium der phylogenetischen Verwandtschaft wurden des Weiteren Stämme ausgewählt, deren Ax-Akkumulation bislang noch nicht beschrieben ist. Zum Vergleich der erhaltenen Carotinidgehalte und -profile wurden die Grünalgen *B. braunii*, *M. zofingiensis* und *H. pluvialis* kultiviert, deren Fähigkeit zur Ax-Biosynthese in der Literatur ebenfalls bereits beschrieben wurde (Borowitzka et al., 1991, Grung et al., 1994, Del Campo et al., 2004, Del Campo et al., 2007).

Die Auswahl der Kultivierungsbedingungen ist für die Induktion der SC-BS und damit für die Ax-Akkumulation entscheidend. Neben einem Nitrat- und Phosphatmangelmedium, welches mit 69 mM eine moderate NaCl-Konzentration enthielt, wurden für die Kultivierungen unter Stressbedingungen Blasensäulenreaktoren mit 100 mL Volumen gewählt ($d = 2,5 \text{ cm}$), um den Lichtweg so kurz wie möglich zu halten. Aus diesem Grund wurde die Zellzahl für alle

Versuche mit $1 \cdot 10^6$ Z/ mL auch verhältnismäßig gering festgelegt, da eine gegenseitige Abschattung der Zellen den Lichteintrag in die Suspension weiter limitiert und die Carotinoausbeute herabsetzen kann (Trösch, 2000, Kang et al., 2007). Es sollte damit ausgeschlossen werden, dass eine zu geringe Lichtintensität die Induktion der SC-Biosynthese trotz Nährstoffmangels verhindert.

Grundsätzlich wird in der Literatur beschrieben, dass Starklicht unter autotrophen Bedingungen eine Voraussetzung für die SC-BS darstellt (Ip und Chen, 2005b) bzw. dass die Lichtintensität der Faktor ist, der die Carotinoausbeute am signifikantesten beeinflusst (Cifuentes et al., 2003). Dies scheint nicht immer zuzutreffen. Für *S. rubescens* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Induktion der SC-Biosynthese unter autotrophen Bedingungen auch ohne die Applikation von Starklicht, aber unter NaCl-Einfluss und Nährstoffmangel erfolgt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Pelah et al. (2004) an *Chlorella zofingiensis* überein, der postulierte, dass der Salzeinfluss Starklicht als induktive Bedingung ablösen kann. Übereinstimmend hierzu konnte in *H. pluvialis*, welcher wie *Dunaliella* der Ordnung Volvocales angehört, eine Induktion der Ax-BS im Dunkeln unter NaCl-Einfluss erzielt werden (Kobayashi et al., 1997b). Für *H. pluvialis* und *D. bardawil* ist die SC-BS übereinstimmend durch die Einwirkung von ROS beschrieben worden (Shaish et al., 1993, Fan et al., 1998). Diese Untersuchungen zeigen, dass die SC-BS in verwandten Mikroalgen von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, von denen nicht jeder einzelne notwendig ist. Darüber hinaus bestehen in der Ordnung Volvocales sowohl in Bezug auf Akkumulationsprodukt und Induktionsbedingungen der CarBS deutliche Unterschiede.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Stressbedingungen während der Kultivierung der verschiedenen Mikroalgen (18 Stämme der Klasse Chlorophyceae) waren in der Mehrzahl der Fälle geeignet, die Ax-Biosynthese zu induzieren. In allen untersuchten Spezies war diese an die Synthese einer komplexen Mischung von SC und ihren Fettsäuremono- und -diestern gebunden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Kopecky et al. (2000) überein, einem der wenigen publizierten Screening-Arbeiten auf dem Gebiet der SC aus Grünalgen.

Aufgrund des Auftretens der SC nach Kultivierung unter Stressbedingungen wie Starklicht und Nährstoffmangel und des völligen Fehlens dieser Verbindungen unter physiologischen Wachstumsbedingungen kann die Bildung dieser SC als Anpassung an Stress betrachtet werden. Ein Schutzmechanismus, v.a. gegen starke Lichteinstrahlung, ist in Algen vor allem deshalb nötig, da sie mit stark wechselnden Lichtverhältnissen konfrontiert sind (z.B. beim Austrocknen von Pfützen oder den Gezeiten). Das Wachstum und das Überleben der Algen unter Stressbedingungen setzt das Vorhandensein einer hohen physiologischen Toleranz und/ oder

resistenter Dauerformen voraus (Dash et al., 1995), als Ergebnis des Zusammenwirkens von strukturellen, physiologischen und biochemischen Veränderungen der Zellen. Diese Beobachtungen und die Interpretation der Ax-Biosynthese als Schutzfunktion vor Stressbedingungen wurden für *H. pluvialis* von Hagen et al. (1993) und von Wang et al. (2003) gemacht.

Die SC-Bildung in den Mikroalgen ist vergleichbar mit der Fruchtreife, der Blütenentwicklung und der Blattseneszenz in höheren Pflanzen. Die Lichtintensität spielt bei diesen Prozessen in Pflanzen (Schofield und Paliyath, 2005) ebenso wie in Mikroalgen (Fabregas et al., 2003) eine entscheidende Rolle. Durch die Veränderung der abiotischen Faktoren verändert sich das Carotinoidspektrum von primär zu sekundär. Eine Ausnahme unter den Chlorophyceen bildet *Dunaliella* (Volvocales, Dunaliellaceae), bei der unter Stressbedingungen eine sekundäre β -Carotin-Akkumulation einsetzt (Ben-Amotz, 1995, Grünwald et al., 2000, Raja et al., 2007). *Dunaliella* synthetisiert also ein Carotinoid welches bereits unter physiologischen Bedingungen, in geringeren Gehalten, vorhanden ist, im Gegensatz zu *H. pluvialis* (Volvocales, Haematococcaceae), der Ax synthetisiert, welches unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden ist.

Die SC-BS lässt sich in zwei Phasen einteilen: Zunächst werden in allen Mikroalgen PC und Chlorophylle abgebaut, anschließend erfolgt entweder die Neusynthese der SC oder der Zelltod. Der Zusammenhang ist in der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht.

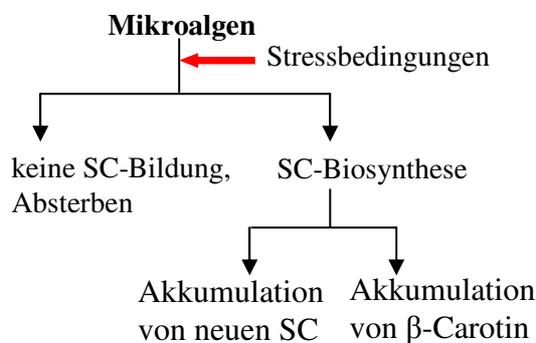


Abbildung 37 : Reaktion der Mikroalgen auf Stressbedingungen

Von Burczyk (1987) und Kessler (1982) wurde die Fähigkeit Sekundärcarotinoide zu bilden in den Chlorophyceen *Ankistrodesmus*, *Haematococcus* und *Scenedesmus* als genussspezifisch beschrieben. Daraus folgt, dass die Carotinoidzusammensetzung innerhalb der Gattungen nur leicht variieren sollte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch den Schluss zu, dass die SC-Biosynthese in *Scenedesmus* nicht genussspezifisch ist, da einige der *Scenedesmus*-Stämme nicht zur SC-Bildung befähigt sind. Diese starben daher unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen ab. Die Variation der SC-Gehalte in den *Scenedesmus*-Spezies war ebenfalls charakteristisch. Die SC-Bildung in *Scenedesmus* sp. verläuft demnach

artspezifisch. Es zeigt weiterhin, dass phylogenetische Verwandtschaft gleichzeitig verschiedene metabolische Funktionen beinhalten kann, wie es in diesem Fall an der SC-Biosynthese gezeigt wurde. Ähnliche Unterschiede wurden auch für die Gattung *Chlorella* in der Reaktion auf Nitratmangel dokumentiert: einige Spezies akkumulieren große Mengen Stärke, während in anderen Spezies Lipide synthetisiert werden (Richardson et al., 1969, Shifrin und Chisholm, 1981, Shehawy und Kleiner, 2001).

Das Spektrum der gebildeten Carotinoide in den untersuchten stressexponierten *Scenedesmus*-Spezies stimmt mit den publizierten Daten in *S. komarekii* (Hanagata und Dubinsky, 1999) und *S. vacuolatus* (Orosa et al., 2001b) überein: Ax, Lutein, Adonirubin, Echinenon und Cx wurden in der Mehrzahl der Spezies identifiziert. Bedeutsam darüber hinaus ist die Identifizierung von Adonixanthin als freies Carotinoid in allen in dieser Arbeit untersuchten Grünalgen, da dieses häufig in höheren Gehalten vorlag als Ax und bislang in *Scenedesmus* nur in neueren Arbeiten beschrieben wurde (Qin et al., 2008). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in den Analysen von Hanagata und Dubinsky (1999) nicht alle freien Carotinoide identifiziert werden konnten. Das publizierte RP18-HPLC-Chromatogramm zeigt jedoch eine ähnliche Elutionsreihenfolge wie die RP30-HPLC-Chromatogramme dieser Arbeit, in der Adonixanthin zwischen Ax und Lutein eluiert (vgl. Abbildung 26, S. 54). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass in *S. komarekii* ebenfalls Adonixanthin gebildet wurde. Die Annahme wird unter Einbeziehung der Analysedaten von Yuan et al. (2002) in *Chlorococcum* sp. unterstützt. Dieser identifizierte Adonixanthin und dessen Fettsäureester vorläufig auf der Grundlage der entsprechenden UV-Vis-Absorptionsspektren. Die Verwendung der Absorptionsmaxima der Carotinoide zur Identifizierung wird jedoch durch die Verwendung von LM-Gradienten während der RP-HPLC als kritisch eingeschätzt. Im Chromatogramm des *Chlorococcum*-Stammes zeigte sich ebenfalls das für *Scenedesmus* sp. typische Elutionsmuster von Ax, Adonixanthin und Lutein. Adonixanthin bzw. Adonixanthinester wurden über diese Stämme hinaus bislang nur in *C. striolata* (Abe et al., 2005) mittels HPLC identifiziert. Durch den Einsatz der Referenzsubstanz Adonixanthin sowie durch die Aufnahme von MS-Spektren konnten die vorläufige Identifizierung von Yuan et al. (2002) in *Chlorococcum* sp. bestätigt und die Daten von Hanagata und Dubinsky (1999) für *S. komarekii* nachträglich erweitert werden. Da Adonixanthin jedoch zwei stereogene Zentren enthält, muss die Konfiguration der Verbindung z.B. durch CD noch ermittelt werden.

Von Burczyk (1987) wurde mittels CD in den Zellwandhomogenisaten von *S. obliquus* jedoch kein Adonixanthin (4-Keto-Zeaxanthin), aber Fritschellaxanthin ((3*S*,3'*R*,6*R*)-3,3'-Di-

hydroxy- β,ϵ -Carotin-4-on, auch: 4-Keto-Lutein) identifiziert. Tanaka et al. (1996) identifizierten mittels NMR in *S. obliquus* dessen Enantiomer α -Doradexanthin ((3*S*,3'*S*,6'*R*)-3,3'-Dihydroxy- β,ϵ -Carotin-4-on). Da aus weiteren Arbeiten über Mikroalgen-Carotinoide keine NMR- oder CD-Daten vorlagen und Referenzsubstanzen für diese Verbindungen nicht erhältlich sind, müssen sowohl die Konstitution als auch die Konfiguration von Adonixanthin bzw. Fritschiellaxanthin in *Scenedesmus* sp. gegenwärtig als ungeklärt angesehen werden.

Die gesammelten Daten von DAD und MS der untersuchten Grünalgen sprechen für die korrekte Identifizierung von Adonixanthin, da die Position der Doppelbindung in α -Stellung (Fritschiellaxanthin) im Vergleich zur β -Stellung (Adonixanthin) sowohl im Absorptionsspektrum als auch im Massenspektrum eine messbare Veränderung hervorruft. Grundsätzlich muss jedoch das Auftreten von verschiedenen Konstitutionsisomeren in einem Organismus in Betracht gezogen werden, wie es in dieser Arbeit für Lutein und Zeaxanthin in *Scenedesmus* sp. und für Adonixanthin und α -Doradexanthin bei Weber (1974) in *Fritschiella tuberosa* gezeigt wurde. Die Unterscheidung von Fritschiellaxanthin und α -Doradexanthin ist durch Enantiomerentrennung möglich.

Die Untersuchung der Zusammensetzung der SC in 15 verschiedenen Mikroalgen unter identischen Stressbedingungen (hohe Lichtintensitäten und Nährstoffmangel) ergab zudem, dass Cx häufig in höheren Gehalten vorlag als Ax. In *T. wisconsinensis* und *B. braunii* war Cx zu über 50% am Gesamtcarotinoidanteil enthalten und stellte darüber hinaus in sechs der 15 Spezies das Carotinoid mit dem höchsten Gehalt dar. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nicht, wie generell angenommen wird, Ax das hauptsächlich gebildete sekundäre Carotinoid ist (Orosa et al., 2001b), sondern Cx. In der Literatur wurde Cx ebenfalls in *Chlorella emersonii* (Arad et al., 1993), *Chlorella zofingiensis* (Pelah et al., 2004), *S. komarekii* (Hanagata und Dubinsky, 1999) und in *Coelastrella striolata* (Abe et al., 2005) als das Hauptcarotinoid identifiziert. Abe et al. (2005) fanden jedoch einen extrem hohen Cx-Gehalt von 47,5 mg/g TS. Dieser war 18,9mal höher als in dem *Coelastrella*-Stamm, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde und 2,4mal höher als der Gesamtcarotinoidgehalt, der in den *H. pluvialis* gemessen wurde. Publierte Daten bezüglich der Carotinoidgehalte sind jedoch aufgrund der verschiedenen Kultivierungsbedingungen grundsätzlich nur begrenzt vergleichbar. Da die Zusammensetzung der Carotinoide im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen nur quantitativ beeinflusst wurde, kann das Auftreten der einzelnen Carotinoide jedoch vergleichend mit der Literatur diskutiert werden. Die schwankenden Ax-Gehalte der Referenz-Grünalgen im Vergleich zu den in der Literatur gefundenen Werten zeigen diese Diskrepanz:

die Ax-Gehalte, die hier unter autotrophen Bedingungen in *H. pluvialis* erreicht wurden (19,4 mg/ g TS), befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Werten von Orosa et al. ((2001b), 22,7 mg Ax/ g TS) wohingegen in *M. zofingiensis* mit 9,5 mg Ax/ g TS 6,3mal mehr Ax detektiert wurde, als bei Del Campo et al. ((2004), 1,5 mg Ax/ g TS). Diese Unterschiede entstehen neben verschiedenen Kultivierungsbedingungen auch durch variierende Analysemethoden.

Von den 1300 Taxa der Gattung *Scenedesmus* (Kessler et al., 1997) wurden in der Vergangenheit nur SC-Analysen von *S. obliquus*, *S. vacuolatus* und *S. komarekii* publiziert. Orosa et al. (2001b) detektierte in *S. vacuolatus* einen Gesamtcarotinoidgehalt von 3 mg/ g TS, in der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Stamm mit 2,7 mg/ g TS ebenfalls ähnliche Gehalte gemessen. In den hier untersuchten *Scenedesmus* sp. war Adonixanthin das freie Carotinoid mit dem größten Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt. Die höchsten Gesamtcarotinoidgehalte erzielten zwei Spezies, deren SC-Gehalte in der Literatur noch nicht beschrieben wurden: *S. rubescens* und *S. producto capitatus*. Daher wurden diese beiden für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt. Die Zusammensetzung der in *S. rubescens* identifizierten sekundären Carotinoide entspricht im Wesentlichen der von *Chlorococcum* sp. (Liu und Lee, 2000) und der von *Coelastrella striolata* (vorliegende Arbeit und Abe et al. (2004)).

Obwohl die Fähigkeit der Chlorophyceen zur Ax-Biosynthese weit verbreitet scheint (Lee und Zhang, 1999) werden nach der Stressexposition nur in Ausnahmefällen SC-Gehalte von mehr als 10 mg/ g TS gemessen. In der vorliegenden Arbeit war dies in den gut untersuchten Spezies *H. pluvialis* (Cysewski und Lorenz, 2004) und *M. zofingiensis* (Chen und Chen, 2006) der Fall, während mit der in der Literatur für Ax-Bildung noch nicht beschriebenen Gattung *T. wisconsinensis* eine Mikroalge identifiziert werden konnte, die ähnliche SC-Gehalte erzielt und daher für weitere Untersuchungen interessant erscheint. Hieran lässt sich auch deutlich zeigen, dass das Potenzial der Mikroalgen für die Carotinoidproduktion noch weitgehend unausgeschöpft ist.

Ein weiterer auffälliger Unterschied zwischen den analysierten Algenarten war neben den unterschiedlichen Carotinoidgehalten der Ester-Anteil am Gesamtcarotinoidgehalt. In *H. pluvialis* ist dieser mit über 95% am größten, gleichzeitig ist dies die Alge, die den höchsten Carotinoidgehalt aufweist. In *H. pluvialis* verläuft die Veresterung des Carotinoids nach der Ax-Biosynthese im Vergleich zu allen anderen Mikroalgen am effizientesten.

Um die Frage zu beantworten, ob eine Beziehung zwischen Esteranteil und Gesamtcarotinoidgehalt besteht, wurden diese Variablen einer Korrelationsanalyse unterzogen, die mit ei-

nem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,64$ einen mäßigen Zusammenhang ergab. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* an die Synthese von Fettsäuren bzw. Triacylglyceriden gekoppelt ist (Zhekisheva et al., 2002). Unter Stickstoff- und Phosphatmangelbedingungen, wie sie hier eingesetzt wurden, steigt der Anteil von Triacylglyceriden und Fettsäuren in einigen Grünalgen und Diatomeen stark an (Siron et al., 1989, Alonso et al., 2000, Zhekisheva et al., 2005). Sie werden in den Lipidvesikeln im Cytoplasma gespeichert und stehen so für eine Veresterung der Carotinoide zur Verfügung. Die Speicherung größerer Mengen dieser lipophilen Chromophore findet ebenfalls nur in Lipidvesikeln statt. Ein linearer Zusammenhang zwischen Ax- und Ölsäuresynthese in *H. pluvialis* wurde für die ersten beiden Tage der Stressexposition gefunden (Zhekisheva et al., 2002). Die Ölsäure ist ebenfalls die Hauptfettsäure im Fettsäureanteil der *Dunaliella salina* (β -Carotin-Akkumulation) (Mendoza et al., 1999). Es wurde beschrieben, dass eine Fettsäuresynthese die Voraussetzung für hohe intrazelluläre Gehalte von Ax ist. Wenn Cerulenin, ein Inhibitor der Fettsäuresynthese, mit *H. pluvialis*-Zellen unter Stressbedingungen kultiviert wurde, zeigte sich eine Inhibierung der Ax-Akkumulation (Schoefs et al., 2001). Rabbani et al. (1998) beschrieben, dass die β -Carotin-Synthese in *Dunaliella* ebenfalls inhibiert wird, wenn die Triacylglyceridsynthese blockiert wurde. Die sich akkumulierenden Neutralfette bilden also die Matrix für die Speicherung der Carotinoide und sind wahrscheinlich zwingend erforderlich für deren massive Akkumulation, eine Hypothese, die auch für *H. pluvialis* beschrieben wurde (Zhekisheva et al., 2002). Dieser Zusammenhang könnte auch einer der Gründe dafür sein, warum mit Ketocarotinoid-Biosynthese-Genen transformierte *E. coli* Zellen nicht mehr als 1,5 mg/ g TS SC akkumulieren konnten (Schmidt-Dannert, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass vergleichsweise hohe Carotinoidgehalte nur in Algenspezies gefunden werden, die einen Carotinoidesteranteil von mehr als 50% aufweisen. Dabei hängt dieser Wert jedoch zusätzlich von der Art der gebildeten Carotinoide ab, die Carotinoide in *T. wisconsinensis* und *Dunaliella* können aufgrund fehlender Hydroxylgruppen nicht verestert werden.

In *Scenedesmus* im Allgemeinen war das Auftreten der freien SC Ax, Adonixanthin und Lutein mit einem Anteil von ca. 30% am Gesamtcarotinoidgehalt typisch, für *S. rubescens* im Besonderen ein Anteil von 79,4% an freien Carotinoiden. Diese Werte befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Messungen in *Chlorococcum* durch Yuan et al. (2002), zeigen aber, dass ein deutlicher Unterschied zu *H. pluvialis* besteht. Ein Grund hierfür könnte eine eingeschränkte Fettsäure-Synthese in *Scenedesmus* sp. sein. In *H. pluvialis* werden für jedes pg Ax fünf pg Fettsäuren synthetisiert (Zhekisheva et al., 2002), die Fettsäuregehalte in

den untersuchten *Scenedesmus* sp. nach Stressexposition sollten daher analysiert und mit denen von *H. pluvialis* verglichen werden.

Der Anteil der Carotinoide, der nach der Kultivierung unverestert vorliegt, ist für die potenzielle Anwendung der Mikroalgen als Futtermittelzusätze besonders interessant. Über die antioxidativen Eigenschaften, die Resorptionskinetik, die Bioverfügbarkeit und die Akkumulation in bestimmten Gewebetypen nach der Aufnahme der Carotinoidester im Vergleich mit freien Carotinoiden in der Nahrung gibt es in der Literatur kontroverse Auffassungen. Unstrittig ist, dass veresterte Carotinoide im Fall von Lachsen und Forellen nicht im Muskelfleisch, sondern im Unterhautfettgewebe gespeichert werden, und damit, selbst wenn ein Teil, wie von Coral-Hinostroza et al. 2004 postuliert wurde, selektiv hydrolysiert wird, eine wesentlich geringere Färbung als unveresterte Carotinoide erzielen können (Britton et al., 1995b). Diejenigen Mikroalgenspezies, die einen hohen Anteil an unveresterten Carotinoiden aufweisen, sind daher für die Fischfärbung besser geeignet als *H. pluvialis*. Darüber hinaus wäre der Einsatz von Cx aus Mikroalgen interessant, da hier keine Umwandlung in Fettsäure-Ester möglich ist.

4.2 *Z,E*-und *R,S*-Isomere des Astaxanthins

Da jede der konjugierten Doppelbindungen in Carotinoiden in *E*- oder *Z*-Form vorliegen kann, ist theoretisch eine Vielzahl von Stereoisomeren möglich (Britton et al., 1995a). Aufgrund von sterischen Behinderungen sind jedoch nur wenige stabil (Bernhard, 1990), und die in der Literatur identifizierten Formen 9*Z*-, 13*Z*- und 15*Z*-Ax (Coral-Hinostroza et al., 2004) wurden nach RP30-HPLC aufgrund der relativen Höhe des *Z*-Peaks im nahen UV-Bereich identifiziert. Bei den beiden unidentifizierten Peaks könnte es sich aufgrund ihrer Elutionsreihenfolge (Nelis et al., 1986) und der Verschiebung des Absorptionsmaximums um ca. 10 nm in den blauen Bereich des Lichtes (Haugan und Aackermann, 1995) um di-*Z*-Formen handeln (9*Z*,9'*Z*, 9*Z*,13'*Z* etc.). Eine eindeutige Identifizierung der *Z/E*-Isomere muss jedoch durch eine NMR-Analyse bestätigt werden. Die Selektivität der eingesetzten RP18-Phase war, wie bereits in der Literatur angegeben, nicht ausreichend, um alle gebildeten *Z/E*-Isomere aufzulösen (Sander et al., 1994). Der Einsatz der RP30-Phase trennte bei ähnlichen Retentionszeiten drei weitere Ax-Isomere. Das Chromatogramm der RP30-Phase zeigte jedoch keine vollständige Basislinientrennung. Diese könnte entweder durch die Erhöhung des Wasseranteils oder durch ein Herabsetzen der Temperatur erreicht werden. Ein höherer Wasseranteil im Eluenten wirkt sich jedoch sowohl nachteilig auf die Löslichkeit des Analyten als auch auf die

Konditionierung der Alkylketten der Säule aus. Eine Erniedrigung der Temperatur ergab in verschiedenen Versuchen, dass selbst ein Absenken um wenige °C mit einer stark verzögerten Retention, stark verbreiterten Peaks und damit einer schlechteren Trenneffizienz verbunden war. Für die Analytik der geometrischen Isomere muss daher unbedingt auf eine konstante Temperierung der Säule geachtet werden. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Böhm (2000) überein, der die starke Verschiebung der Retentionszeiten durch Temperatureinfluss am Beispiel des Lycopins zeigte.

Im Gegensatz zu Yuan und Chen (2000), die nach einer alkalischen Esterhydrolyse aus *H. pluvialis* 1,3% Z-Ax isolierten, wurde in *Scenedesmus* sp. Ax ausschließlich in der all-*E*-Form identifiziert. Aus *Chlorococcum* sp. konnte ebenfalls nur all-*E*-Ax isoliert werden (Ma und Chen, 2001). Für die Analyse der *Z,E*-Isomere sollte eine Verseifung der Extrakte vermieden werden. In *H. pluvialis* und *S. rubescens* wurden jedoch jeweils Z-Cx identifiziert, welches aufgrund seines zusätzlichen Absorptionsmaximums als UV-Filter fungieren kann.

Sowohl Mikroalgen als auch heterotrophe Mikroorganismen synthetisieren Ax in hoher Enantiomerenreinheit entweder als 3*S*,3'*S*- oder als 3*R*,3'*R*-Isomer (Bernhard, 1990). Da diese Enantiomere verschiedene physiologische Eigenschaften aufweisen, ist deren Analyse für die Untersuchung von Aufnahme und Verteilung des Ax im Organismus essentiell. Um die Enantiomerenform in *S. rubescens* bestimmen zu können, wurden verschieden chirale HPLC-Phasen für die Trennung der Ax-Isomere eingesetzt. Die Pirkel-Phasen (Typ 1 CSPs) trennen Enantiomere aufgrund von π - π Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Dipolmomenten. Eine der wenigen publizierten Methoden zur chiralen Trennung von Ax (Turujman, 1993) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Es scheint, dass unter den verwendeten RP-Bedingungen die Elektronenwechselwirkungen der π -Elektronenakzeptorphase mit dem Analyten zu schwach ausgeprägt sind, um eine ausreichende Enantioselektivität zu erreichen. Die modifizierten Polysaccharide (Typ 2 CSPs) nutzen zusätzlich zu den Elektronenwechselwirkungen das Einschlussprinzip. Zu den eingesetzten Chiragrom-Phasen war keine Strukturinformation erhältlich, lediglich deren Klassifizierung als CSP-Typ 2. Das β -Cyclodextrin trennt ausschließlich nach dem Einschlussprinzip in einen Hohlraum. Für das Ax, mit seinen endständigen Hydroxylgruppen, könnte die Elektronendichte in diesem Hohlraum zu groß sein. Darüber hinaus könnte der Hohlraum mit 8 Å einen zu geringen Durchmesser für den β -Iononring mit seinen voluminösen Keto- und Hydroxylgruppen aufweisen und damit für eine ausreichende Retention und eine Trennung der Enantiomere ungeeignet sein.

Die enantioselektive Trennung, die mit der Chiralcel OD-RH-Phase erreicht wurde, geht sehr wahrscheinlich auf die Kombination der beiden Retentionsmechanismen zurück: des Einschlussprinzips sowie der polaren und der π - π -Elektronenwechselwirkungen zwischen dem Cellulosederivat und dem Carotinoid. Obwohl verschiedene modifizierte Polysaccharid-Phasen unter Normalphasenbedingungen auf ihre Enantioselektivität hin untersucht wurden, führte nur der Umkehrphasen-Modus zu einer ausreichenden Trennung. Dieses Phänomen geht wahrscheinlich auf die Lipophilie des Ax zurück, im NP-Modus sind die Wechselwirkungen zwischen Carotinoid und mobiler Phase zu stark für eine Retention an der stationären Phase.

Die in der Carotinoidanalytik häufig verwendeten lipophilen Lösungsmittel wie z.B. Aceton und Ethylacetat konnten aufgrund der mangelnden Stabilität des Säulenmaterials (Herstellerangabe) der OD-RH-Säule nicht eingesetzt werden. Dies kann zu Löslichkeitsproblemen mit den unpolaren Carotinoiden führen. Die in vielen Algen auftretenden Carotinoidester müssen daher aufgrund des stark lipophilen Charakters vor der Trennung schonend (enzymatisch) hydrolysiert oder aus der Probe entfernt werden (z.B. mittels DC).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine HPLC-Methode publiziert, welche die Konfiguration mikrobieller Ax-Enantiomere direkt bestimmt (Grewe et al., 2007). Die ermittelte Konfiguration der Ax-Enantiomere in der Mikroalge *S. rubescens* (3*S*,3'*S*) und in der Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* (3*R*,3'*R*) ist identisch zu den Ergebnissen der Literatur, in der die Konfiguration mit Hilfe der Umwandlung in Diastereomere (mittels (-)-Camphansäurechlorid) und deren anschließender Trennung an achiralen Phasen publiziert wurde (Vecchi und Müller, 1979, Schiedt et al., 1981). Burczyk (1987) bestimmte die Chiralität von Ketocarotinoiden aus den Zellwänden von *Chlorella fusca* und *Scenedesmus obliquus* mittels CD. Die Auswertung der Spektren ergab ebenfalls das Vorkommen von 3*S*,3'*S*-Ax in diesen beiden Gattungen. Die Anwendung dieser Methode macht z.B. die einfache Unterscheidung von Wildlachs und Zuchtlachs möglich, die im Muskelfleisch entweder natürliches (*S,S*-Ax) oder synthetisches Ax (Isomerengemisch) enthalten.

4.3 LC-APCI-MS-Analytik der Carotinoide

Da in der Natur eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Carotinoiden existiert, die z.T. strukturell sehr ähnlich sind, gestaltet sich die Analytik dieser Verbindungen schwierig und einfache HPLC-Analysen reichen für eine eindeutige Identifizierung der Carotinoide oft nicht aus. Aufgrund der steigenden Anwendungen, die sich aus den komplexen biologischen Funk-

tionen ergeben, resultiert die Notwendigkeit, diese Verbindungen bzw. deren Metabolite aus komplexen biologischen Matrices identifizieren und quantifizieren zu können. Die Kopplung von HPLC und MS ist eine in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode, die für dieses Ziel gut geeignet ist (Fernández et al., 2000). Auf diese Weise konnte eine Identifizierung ohne vorherige alkalische Verseifung oder enzymatische Hydrolyse der Probe erreicht werden. Die HPLC-Retentionszeiten, Diodenarray-Absorptionsspektren und die massenspektrometrischen Daten (Molekülmassen und Fragmentierungsmuster) wurden mit vorhandenen Referenzsubstanzen verglichen und führten zur Charakterisierung der Carotinoide, die in den gewonnenen Mikroalgenextrakten detektiert werden konnten (s. Anhang E).

Mit etablierten HPLC-DAD-Methoden zur Quantifizierung von Carotinoiden und ihrer Fettsäureester in *H. pluvialis* (Yuan et al., 1996) ist es nicht möglich, die Ax-Ester zu identifizieren. Anhand der HPLC-Chromatogramme ist lediglich eine Unterscheidung zwischen Mono- und Diester möglich. Hierbei wurde für eine verbesserte Auflösung eine RP30-Phase eingesetzt. Die bessere Trennung geht vor allem auf die Tatsache zurück, dass die hydrophoben Wechselwirkungen des Säulenmaterials mit den lipophilen Carotinoiden deutlich stärker ausgeprägt sind. Für die Analytik dieser stark hydrophoben Carotinoidester (C₅₆-C₇₆-Verbindungen) wurde daher standardmäßig eine RP30-Phase eingesetzt. Deren Eignung für die Carotinoidanalytik wurde bereits in anderen Arbeiten erfolgreich nachgewiesen (Dachtler, 2000, Glaser, 2001).

Der erfolglose Einsatz der Elektrospray-Ionisierung für die Carotinoide liegt wahrscheinlich im Ionisierungspotential der π -Elektronen in den konjugierten Doppelbindungen des Polyens begründet, welches für eine Protonierung zu schwach ausgeprägt ist. Daher lässt sich diese Technik für Carotinoide nur mittels Einsatz von organischen Eluentenmodifiern wie z.B. Ammoniumacetat, Triethylamin (Careri et al., 1999) oder Heptafluorobutanol (van Breemen, 1996) anwenden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte APCI wurde auch in anderen Arbeiten für die LC-MS-Analytik von Carotinoiden eingesetzt (Breithaupt, 2004, Bhosale et al., 2006, Webera et al., 2007). Es wurden im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Anionen [(M-H)⁻] (van Breemen et al., 1996, Breithaupt, 2004) nur positiv geladene Ionen erzeugt.

Alle Fettsäurereste wurden aufgrund der Massendifferenz der relativen Molekülmasse des Carotinoidesters und des entsprechenden Carotinoides berechnet. In Ermangelung von Referenzsubstanzen der Carotinoidester wird dieses Verfahren von den wenigen existierenden Arbeitsgruppen, die mit ähnlichen Fragestellungen arbeiten, ebenfalls eingesetzt (Takaichi et al.,

2003, Breithaupt, 2004, Miao et al., 2006). Die LC-MS-Kopplung erlaubt jedoch keine genauere Bestimmung der Fettsäure, wie z.B. die Lokalisierung der Position der Doppelbindung, eine korrekte Identifizierung der Fettsäurederivate kann jedoch nur durch zusätzliche Analysemethoden wie z.B. NMR erreicht werden.

Die mittels HPLC-Analyse erfolgte Einteilung der SC der untersuchten Grünalgen wurde mittels LC-MS bestätigt: es handelte sich um Ketocarotinoide, Hydroxycarotinoide und deren Fettsäuremono- und -diester. Die in MS³-Experimenten aufgetretenen Fragmente im niederen Massenbereich wurden ebenfalls in der Literatur für verschiedene Xanthophylle beschrieben (van Breemen et al., 1996, Wingerath et al., 1996). Die Interpretation der Massenpeaks erscheint für die Identifizierung der Carotinoide jedoch nur im höheren Massenbereich sinnvoll. Die MS-Analyse der unveresterten Carotinoide zeigte Unterschiede zwischen Hydroxy-, Epoxy- und Ketocarotinoiden. Durch das Vorhandensein von polaren funktionellen Gruppen z.B. Hydroxylgruppen am ϵ -Iononring des zyklischen Carotinoides wurde eine Identifizierung von Konstitutionsisomeren, wie z.B. von Lutein und Zeaxanthin möglich. Da die Hydroxylgruppe einen -I-Effekt aufweist und die Doppelbindung im ϵ -Iononring isoliert und nicht, wie im Fall von Zeaxanthin konjugiert ist, wird hier im Anschluss an die Protonierung eine Abspaltung der Hydroxylgruppe in Form von Wasser erleichtert. Es entstehen drei mesomere Grenzstrukturen, die dieses Molekül stabilisieren. Diese Beobachtung wurde für die Konstitutionsisomere Lutein und Zeaxanthin ebenfalls von Dachtler (2000) gemacht. Es ergibt sich also für die Konstitutionsisomere Lutein und Zeaxanthin durch die veränderte Stellung der Doppelbindung im Iononring ein unterschiedliches Ionisierungsverhalten und damit ein Unterscheidungsmerkmal. Dies ist vor allem aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Verbindungen von Bedeutung, da sie in der Anwendung der RP-Chromatographie häufig koeluiieren, bzw. bei höheren Konzentrationen nicht mehr getrennt werden. Für die *Scenedesmus*-Spezies konnte so nachgewiesen werden, dass Lutein in hohen Gehalten in den stressexponierten Stämmen vorkommt.

Eine häufige Wasserabspaltung wurde ebenfalls für die epoxidierten Xanthophylle Neoxanthin und Violaxanthin gemessen, die Tochterionen $[M+H-H_2O]^+$ traten mit 97,2 bzw. 84,8% der Intensität des Mutterions auf. Das Fragment $[M+H-2*H_2O]^+$ lies sich mit relativen Intensitäten von ca. 4% für beide Xanthophylle detektieren. Diese Fragmentierungsreaktion wurde für die Xanthophylle bereits von Clarke et al. (1996) unter Verwendung eines Quadrupols (single quad) erzielt. Die in dieser Arbeit verwendete Ionenfalle produziert unter anderen Ionisierung- und MS-Bedingungen in dieser Hinsicht vergleichbare Ergebnisse. Die Ketocarotinoide hingegen lieferten alle stabile Ionenausbeuten im Massenbereich der theoretisch ermit-

telten Molekülmasse $+H^+$, was wiederum gegen das Auftreten von Fritschiellaxanthin spricht, welches in *Scenedesmus* sp. von Burczyk (1994) gefunden wurde.

Eine der wenigen verfügbaren Arbeiten über die Zusammensetzung der SC in *Scenedesmus* sp. von Hanagata und Dubinsky (1999) identifizierte die detektierten Carotinoidester in *S. komarekii* basierend auf HPLC-Daten als Ax-Ester. Die MS-Analysen der *Scenedesmus*-Extrakte dieser Arbeit zeigten, dass Ax-Ester zwar die Hauptkomponenten im Esteranteil darstellen (95% in *S. rubescens*), jedoch ebenfalls Lutein- und Adonixanthinester auftraten, die häufig mit den Ax-Estern koeluierten. Auch die Vorstufe des Cx, das Echinenon, eluierte zwischen den Carotinoidesteren und konnte nur durch das Ionenchromatogramm seiner protonierten quasimolekularen Masse detektiert werden. Eine aktuelle Arbeit von Qin et al. (2008) analysiert die Pigmente in *S. obliquus* nach Stressexposition mittels LC-MS, nimmt jedoch keine Identifizierung der gebildeten Carotinoidesteren vor.

Die Identifizierung der Carotinoidesteren ist von großer Bedeutung, da der starke lipophile Charakter der Verbindungen die Ursache für die Speicherung des Farbstoffderivates im Unterhautfettgewebe der Salmoniden (Lachse und Forellen) ist. Carotinoidesteren tragen nicht zur Färbung des Fisches bei, da diese auf die Bindung freier Hydroxylgruppen des Carotinoidesteren an polare Gruppen am Muskelprotein zurückgeht (Britton et al., 1995b, Matthews et al., 2006). Darüber hinaus werden carotinoidehaltige Pflanzen und Mikroalgen in der menschlichen Ernährung eingesetzt, daher müssen die Zusammensetzung und die Menge der Pigmente genau bekannt sein.

Die Bestimmung der Zusammensetzung der Carotinoidesteren in *H. pluvialis* mittels MS wurde bislang nur durch wenige weitere Arbeitsgruppen publiziert: Breithaupt et al. (2004) und Miao et al. (2006). Diese beiden Arbeiten identifizierten ausschließlich Ax-Mono- und -Diester. Diese Resultate konnten mit den Analysen dieser Arbeit erweitert werden. In *H. pluvialis* wurden darüber hinaus auch fünf verschiedene Adonirubinmonoester (12% Anteil an der Monoesterfraktion) und ein Luteinmonoester detektiert. Aufgrund der starken Koelution der Monoesteren mussten selektive Ionenchromatogramme aller freien Carotinoide über den gesamten Chromatographielauf aufgenommen werden, um diese Ester detektieren zu können. Das Vorhandensein von Adonirubinesteren in *H. pluvialis* wurde nach Analyse mittels GC bereits von Kobayashi (1993) beschrieben, wobei der Anteil abhängig vom eingesetzten Kulturmedium war. Ax-Linoleat und Ax-Oleat wurden wie bei Miao et al. (2006) als vorherrschende Carotinoide bestimmt. Diese Ergebnisse sind identisch zu denen von Zhekisheva et al. (2002), der

mittels GC ebenfalls diese beiden Ax-Monoester als Hauptkomponenten in *H. pluvialis* bestimmte. Im Gegensatz dazu entspricht diese Zusammensetzung nicht der, die durch die nach Überführung in Fettsäuremethylester mittels GC von Renstrom und Liaaen-Jensen (1981) bestimmt wurde. Dies liegt eventuell an den Verseifungsbedingungen zur Esterhydrolyse oder an den GC-Bedingungen. Da v.a. Ax alkali- und temperaturlabil ist (Yuan und Chen, 1999), sind Artefakte in der Probe eher zu erwarten. Echinenon konnte in *H. pluvialis* nicht gemessen werden, was wahrscheinlich an dem geringen Gehalt und der Koelution mit den Carotinoidestern liegt.

Der Optimierung des HPLC-Gradienten kam trotz des Einsatzes der MS eine wichtige Bedeutung zu, da durch eine bessere Trennung der Mono- und Diester mehr Einzelverbindungen identifiziert werden konnten als bei Breithaupt et al. (2004) und Miao et al. (2006), deren Chromatogramme noch deutlich sichtbare Koelutionen aufwiesen (Identifizierung von 6 ME und 7 DE bzw. von 8 ME und 10 DE). Hier wurden insgesamt 16 ME und 9 DE identifiziert, wobei davon ausgegangen werden kann, dass das SC-Esterspektrum so komplex ist, da grundsätzlich alle in den Lipidglobuli vorhandenen Fettsäuren (Zhekisheva et al., 2002) zur Estersynthese zur Verfügung stehen.

Da es sich bei *S. rubescens* um eine Grünalge handelt, deren Carotinoidesterzusammensetzung wie auch die anderer *Scenedesmus* sp. nicht publiziert ist, können vergleichende Betrachtungen gegenwärtig nur mit *H. pluvialis* durchgeführt werden. Das Spektrum der detektierten Fettsäuren war dem des *H. pluvialis* ähnlich, es wurden in *S. rubescens* jedoch nur C18- und C20-Fettsäuren detektiert. Ax-Oleat war ebenfalls eine der beiden Hauptkomponenten, Ax-Stearat, welches in *H. pluvialis* einen geringeren Gehalt aufwies als Ax-Linolenat, wurde hier als zweite Hauptkomponente im Esteranteil detektiert. Neben Ax-Estern konnten in *S. rubescens* vier Adonixanthinester und zwei Luteinester nachgewiesen werden, aber keine Adonirubinester. Das veränderte Spektrum der Carotinoidmonoester geht eventuell auf die quantitativen Unterschiede bei den freien Carotinoiden zurück. Adonixanthin macht in *Scenedesmus* sp. einen hohen Anteil aus, daher können mehr Adonixanthinester entstehen. Das gebildete Fettsäurespektrum, welches innerhalb der Carotinoidester gemessen wurde, stimmt im Wesentlichen mit dem Fettsäurespektrum überein, welches im grünen *S. obliquus* identifiziert wurde (Wiltshire et al., 2000). Nur Palmitinsäure konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl sie in ungestressten Zellen in ähnlichen Gehalten vorkommt wie α -Linolensäure, deren Ax-ME detektiert wurde.

4.4 Veränderungen der Morphologie und des Carotinoidspektrums in *H. pluvialis* und *S. rubescens* während der Stressexposition

Der Abbau der Chlorophylle fand, wie bei Czygan (1968b) beschrieben, in allen untersuchten Mikroalgen simultan und sofort nach Einsetzen der Stressbedingungen statt, während die Ax-Biosynthese verzögert nach 2-4 Tagen begann. Diese Bildung von Ax und der weiteren SC konnte anhand des Farbumschlages der Kulturen von Grün über Braun bis zum Orange beobachtet, und anhand der LC-MS-Analysen bestätigt werden. Dieser Farbumschlag geht auf den Abbau der Chlorophylle und primären Carotinoide sowie den Aufbau der SC zurück und entspricht den Beobachtungen von Czygan (1968a), Bar et al. (1995) und Kopecky et al. (2000) in coccalen Chlorophyceen. Die Maskierung der Carotinoide durch die Chlorophylle nimmt mit sinkendem Gehalt in der Zelle ab, die Mischung aus den grünen Chlorophyllen, den gelben Xanthophyllen und den orange SC entspricht der beobachteten braunen Färbung der Kulturen in der Übergangsphase der Algen in das Palmella-Stadium.

Die morphologischen Veränderungen, die mit der SC-Biosynthese einhergehen, zeigten in *H. pluvialis* und *S. rubescens* deutliche Parallelen, was auf einen ähnlichen Ablauf im Stoffwechsel schließen lässt. Die Ax-BS in *H. pluvialis* begann, wie von Wang et al. (2003) beschrieben in der unmittelbaren Umgebung des Zellkerns. Da Carotinoide für ihre Eigenschaft bekannt sind, freie Radikale abzufangen, würde man sie in der Zelle an Stellen erwarten, an denen vermehrt Sauerstoffradikale entstehen, z.B. in den Mitochondrien. In den Mitochondrien von *Neurospora crassa* und in *Phycomyces*-Arten wurden auch Carotinoide gefunden (Kobayashi, 1993), aber in Grünalgen akkumulieren die SC im Cytoplasma in Lipidvesikeln. Das trifft auch für die Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* zu, wo die Vesikel mit der Cytoplasmamembran assoziiert sind (Johnson und An, 1991).

In der coccalen Grünalge *S. rubescens* wurde, wie in *H. pluvialis*, ebenfalls eine Akkumulation der Carotinoide in Lipidvesikeln und eine Erhöhung des Zelldurchmessers (von 5 auf 10 µm) beobachtet. In den beobachteten Lipidvesikeln akkumulieren Fettsäuren, ein Phänomen, welches aufgrund von Phosphatmangel von Tillberg und Rowley (1989) in *Scenedesmus* sp. bereits beschrieben wurde. Hanagata und Dubinsky (1999) fanden diese Lipidvesikel in *S. komarekii*, während Bar et al. (1995) diese in *Chlorella zofingiensis* detektierten. Die Bildung von extraplastidären Lipidvesikeln in *H. pluvialis* im Cytoplasma wurde bereits von Wang et al. (2003) und Zhekisheva et al. (2002) beschrieben, Santos und Mesquita (1984) berichteten erstmals, dass die Carotinogenese im Bereich des Nukleus beginnt und dass sich die Lipidvesikel zur Zellperipherie bewegen. Die anschließende Koaleszenz der Lipidglobuli führt dazu, dass sich ein geschlossener Lipid-Carotinoidfilm an der Cytoplasmamembran ausbilden kann.

Diese Beobachtungen sprechen für die postulierte Lichtschutzfunktion der SC, eine „Sonnenblende“ entsteht (Hagen et al., 1994).

Neben der genauen Identifizierung der Ester sollte in *H. pluvialis*, der Algenspezies mit den höchsten Esteranteilen, die Frage beantwortet werden, ob durch die Wahl des Kultivierungsmediums das Biomassewachstum und die Zusammensetzung oder der Anteil der einzelnen Ester beeinflusst werden kann. Hierfür wurden drei autotrophe Mangelmedien (OHM-, BBM- und PET-Stress) eingesetzt, um das Kontaminationsrisiko bei der langsam wachsenden Alge möglichst gering zu halten, obwohl der Einsatz von z.B. Natriumacetat in der Vergangenheit zu höheren Ax-Gehalten führte (Kobayashi et al., 1993, Tripathi et al., 1999, Orosa et al., 2001b).

Das langsame Wachstum von *H. pluvialis* begründet sich in den unphysiologischen Kulturbedingungen, die für die Induktion der Ax-Biosynthese nötig sind. Da die Medien alle kein oder nur Spuren von Nitrat enthalten, war das Wachstum stark eingeschränkt und die erhaltenen Biomasseproduktivitäten sind vergleichbar mit denen, die von Orosa et al. (2005) in einem Mangelmedium für *H. pluvialis* beschrieben wurden. Die höheren Biomasseausbeuten im OHM- und BBM- gegenüber dem PET-Stressmedium begründen sich sehr wahrscheinlich auf das Vorhandensein der B-Vitamine, die im algalen Metabolismus wichtige Funktionen inne haben und das Wachstum stimulieren, wie es von Pringsheim (1966) beschrieben wurde. Die Ionenkonzentration im OHM-Stressmedium war ebenfalls am höchsten. Hieraus resultiert, dass das Wachstum am längsten aufrechterhalten werden konnte, die SC-Bildung setzte erst später ein, woraus niedrigere SC-Ausbeuten resultieren. Das versetzte Erreichen der stationären Phase in verschiedenen autotrophen Medien wurde in *H. pluvialis* ebenfalls von Domínguez-Bocanegra et al. (2004) beschrieben. Das PET-Stressmedium, welches im Vergleich die höchsten Carotinoausbeuten erzielte, enthielt als einziges Fe^{2+} -Ionen. Diese können über die Fenton-Reaktion zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen führen, die dafür bekannt sind, die SC-Biosynthese zu induzieren (Kobayashi, 1993). Gleichzeitig enthält es die höchste NaCl-Konzentration (0,8 mM), ein Faktor, welcher die Bildung der SC fördert (Bhosale, 2004) obwohl in der Regel höhere Salzkonzentrationen eingesetzt werden (Cifuentes et al., 2003).

In *H. pluvialis* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Biomasseausbeute und die Carotinoausbeute sich umgekehrt proportional verhalten, d.h. im Medium mit der höchsten Biomassekonzentration (OHM-Stress) der geringste Gehalt an SC gemessen wurde. Daraus folgt,

dass Bedingungen, die zu hohen Gehalten an den Carotinoiden führen, immer auch niedrige Biomasseausbeuten verursachen und damit die Carotinoideausbeute verringern. Diese Beobachtungen sind identisch zu denen verschiedener Autoren (Fan et al., 1994, Boussiba, 2000). Der Sachverhalt begründet sich wahrscheinlich in der Funktion der SC, die als Schutz vor massiver Sonneneinstrahlung gebildet werden (Hagen et al., 1994). In diesem morphologischen Stadium sind die Algenzellen mit den Sporen von Bakterien vergleichbar, die gebildet werden, um ungünstige Umweltbedingungen zu überleben. Diese Ergebnisse machen die Optimierung des biotechnologischen Produktionsprozesses sehr schwierig, die sowohl auf maximale Biomasse- als auch auf maximale Carotinoideausbeuten abzielt.

In der Literatur gibt es bislang keine Daten über die Veränderung der Carotinoidzusammensetzung während der Stressexposition, die zwischen freien und Carotinoidestern unterscheiden. Boussiba et al. (1999) analysierte den zeitabhängigen Verlauf mittels GC, da die Proben jedoch verseift wurden, ist ein Rückschluss über den Anteil an Mono- und Diestern sowie die Zuordnung der genauen Zusammensetzung nicht möglich. Die SC-Bildung setzte nach Beginn der Stressexposition sehr schnell ein. Nach zwei bis drei Tagen konnten Ax und dessen Mono- und Diester detektiert werden, unter den eingesetzten Kultivierungsbedingungen trat kein zeitabhängiger Unterschied zwischen der Bildung der freien Carotinoide und der Ester auf, wie es von Orosa et al. (2001b) vorgeschlagen wurde. Sobald die freien SC gebildet wurden, begann simultan deren Veresterung. Nur die Akkumulation der Mono- und Diester verändert sich mit dem Alter der Kultur, wie es auch von Orosa et al. (2001a) beobachtet wurde. Signifikante Unterschiede zwischen den Medien bezüglich der prozentualen Carotinoidzusammensetzung wurden nur in den ersten 10 Tagen detektiert, anschließend variiert nur noch das Verhältnis zwischen Mono- und Diestern. Die Differenzen im Bereich der ersten Kultivierungstage gehen wahrscheinlich auf ein verzögertes Einsetzen der SC-BS zurück. Auf das Verhältnis zwischen Mono- und Diestern haben die eingesetzten Medien ebenfalls einen signifikanten Einfluss, die Zusammensetzung der einzelnen Carotinoidmono- und diester ist jedoch identisch. Es ist dabei herauszustellen, dass diese Unterschiede in der prozentualen Esterzusammensetzung unabhängig von der Lichtintensität sind und nur auf die veränderte Medienzusammensetzung zurückgehen.

Die zeitabhängige Veränderung der Pigmentzusammensetzung in *S. rubescens* während der Stressexposition verlief im Wesentlichen später als in *H. pluvialis*. In *Chlorococcum* wurde eine Akkumulation von Ax ebenfalls bereits nach einem Tag detektiert (Yuan et al., 2002). Ein Farbumschlag der Kulturen von Grün über Braun zu Orange konnte erst nach 4 Tagen

beobachtet werden. Die drei SC Ax, Adonixanthin und Cx treten erstmals nach vier Tagen auf und damit ca. 2,5 Tage später als in *H. pluvialis*. Es wurde ebenfalls keine Zeitdifferenz in der Entstehung von freien SC und den korrespondierenden Monoestern gemessen, die Diester wurden jedoch erst nach sechs Tagen detektiert. Der Chlorophyllgehalt nahm während der SC-Synthese kontinuierlich ab, im Vergleich zu *H. pluvialis* waren diese jedoch nach Versuchsende noch nachweisbar. Nach einem Transfer in Wachstumsbedingungen sollte daher eine Regenerierung der Zellen, die eine Rückbildung der SC und einen Aufbau der primären Carotinoide und Chlorophylle beinhaltet, schneller vonstattengehen. Dieser Prozess wurde für Nitratmangel-Kulturen von *H. pluvialis* (Vidhyavathi et al., 2007), *Botryococcus braunii* (Grung et al., 1994) und *Chlorella fusca* (Pyliotis und Goodchild, 1975) bereits beschrieben.

Interessant ist die Tatsache, dass der Gesamtcarotinoidgehalt bis zum Zeitpunkt des ersten Auftretens der SC in *S. rubescens* um 68,1% ($P = 0,003$) absinkt, und erst nach 6 Tagen Stressexposition wieder ansteigt. Dieses Phänomen lässt sich nicht einfach durch die Einführung von Sauerstoff-haltigen funktionellen Gruppen in die bereits vorhandenen PC erklären. In diesem Fall sollte der Carotinoidgehalt nicht absinken. In *H. pluvialis* wurde dieselbe Beobachtung gemacht, obwohl hier die Ax-Biosynthese wesentlich schneller einsetzte. Ein Grund hierfür könnte die Schädigung der Chloroplasten durch die erhöhte Strahlung sein, die aufgrund der zunächst fehlenden SC nicht absorbiert werden kann. Erst mit der Bildung der SC steigt der Carotinoidgehalt wieder an und aufgrund des verbleibenden Chlorophyllanteils ist weiterhin photosynthetische Aktivität möglich.

Der Anteil der Mono- und Diester am Gesamtcarotinoidgehalt stieg auch in *S. rubescens* mit zunehmendem Alter der Kulturen an (vgl. *H. pluvialis*). Nach 18 Tagen nahm die Carotinoidekonzentration bereits wieder ab, woraus geschlossen werden kann, dass längere Kultivierungszeiten für die Carotinoideproduktion nicht geeignet sind.

Während der Stressexposition war zu beobachten, dass die Biomassekonzentration von *S. rubescens* trotz der Mangelbedingungen weiter anstieg. Die Zunahme der TS wurde in der Vergangenheit auf einen vergrößerten Zelldurchmesser zurückgeführt. Für *H. pluvialis* (Fan et al., 1994), *Chlorella zofingiensis* (Rise et al., 1994) und *Chlorococcum* sp. (Masojidek et al., 1999) wurde berichtet, dass die Stressbedingungen zu einem Teilungsstopp der Zellen führten. Die Messung der Zellzahl über den gesamten Kultivierungszeitraum verdeutlicht jedoch, dass die Zellen von *S. rubescens* sich, trotz induzierter CarBS, weiter teilen. Dieses Phänomen wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bei *H. pluvialis* beobachtet. Da es sich bei der SC-BS u.a. um eine Adaptionsreaktion an das Starklicht handelt, scheint das Wachstum der Zellen ein Indiz für diese Hypothese darzustellen. Die Adaption an die Lichtbedingungen

ermöglicht ein weiteres Wachstum der Zellen, erst wenn die Photosynthesepigmente aufgrund des Nitratmangels komplett abgebaut sind und eine Proteinsynthese nicht mehr möglich ist, wird die stationäre Wachstumsphase erreicht.

4.5 Klonierung des β -Carotin-Ketolase-Gens (*BKT*) und Ax-Biosynthese

Die β -Carotin-Ketolase (*BKT*) ist ein Schlüsselenzym in der Stress-initiierten SC-Biosynthese in Algen (Meng et al., 2006). Das Enzym katalysiert die Einführung der Keto-Funktion am C-4-Atom beider β -Iononringe, also die Bildung des Ketons Echinenon aus β -Carotin und im nächsten Schritt die Bildung von Cx aus Echinenon, einem wichtigen Intermediat in der Ax-Biosynthese (Fraser et al., 1997). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, handelt es sich bei Cx in vielen Mikroalgen um das sekundäre Carotinoid mit den höchsten intrazellulären Gehalten. Die *BKT* ist dabei das einzige Enzym im SC-Biosyntheseweg, welches ausschließlich an der Synthese von sekundären Carotinoiden beteiligt ist. Bislang wurden in *H. pluvialis* drei verschiedene *BKT*-Gene identifiziert (Huang et al., 2006b) und jeweils ein *BKT*-Gen aus *Chlorella zofingiensis* (Huang et al., 2006a) und aus *Nostoc punctiforme* (Steiger und Sandmann, 2004).

Ziel dieser Arbeit sollte daher der Nachweis sein, dass die Ax-Biosynthese in *Scenedesmus* ebenfalls über eine β -Carotin-Ketolase verläuft, wie in *H. pluvialis* (Kajiwara et al., 1995) und *Chlorella zofingiensis* gezeigt wurde (Huang et al., 2006b). Da aus der Literatur keinerlei Informationen über Struktur, Regulation und Anzahl der Ax-Biosynthese-Gene der Gattung *Scenedesmus* verfügbar waren, stellte die Untersuchung der *BKT* den Ansatzpunkt der Sekundärcarotinoid-Biosynthese auf molekularbiologischer Ebene dar. Ausgehend von der Sequenz des Ax-Biosynthese-Gens *BKT* (AC Nr. X86782) aus *H. pluvialis* konnte mit Hilfe von degenerierten Primern eine *BKT*-Sequenz aus einer *Scenedesmus*-Spezies (*S. producto capitatus*) kloniert werden. Der Sequenzvergleich der klonierten *BKT* mit der NCBI-Datenbank ergab Sequenzorthologien zwischen *H. pluvialis* (43% Identität), *Chlorella zofingiensis* (46% Identität) und *Chlamydomonas* (52% Identität). Dieses Ergebnis weist einerseits darauf hin, dass es sich bei dem klonierten Fragment um eine Teilsequenz einer *BKT* handelt, und andererseits, dass die *BKTs* der verschiedenen Chlorophyceen in weiten Bereichen sowohl über konservierte als auch über ähnliche Aminosäure-Sequenzen verfügen. Diese können daher mit Hilfe von degenerierten Primern, abgeleitet aus konservierten Bereichen, kloniert werden. Diese strukturellen Ähnlichkeiten wurden ebenfalls für das β -Carotin-Hydroxylase-Gen (*CRT-Z*) aus *H. pluvialis* und *Chlamydomonas* dokumentiert (Tan et al., 2007), das zweite für die SC-Biosynthese wichtige Gen.

Trotz der geringen Annealing Temperatur von 40°C wurde mit den eingesetzten degenerierten Primern im Fall von *S. producto capitatus* nur das erwartete Fragment von 396 bp erhalten, es traten keine unspezifischen Banden auf. Im Fall von *S. rubescens* wurden mit denselben degenerierten Primern jedoch keine *BKT*-Fragmente erhalten. Auch mit den durchgeführten Northern-Analysen konnte in *S. rubescens* keine *BKT*-mRNA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt möglicherweise auf eine abweichende Aminosäure-Sequenz im ausgewählten Bereich des Gens schließen, wenngleich dies aufgrund der gefundenen Orthologie zu Spezies anderer Gattungen (*T. wisconsinensis*, Familie Scenedesmeaceae) und anderer Ordnungen (*H. pluvialis* und *Chlamydomonas*, Ordnung Volvocales) nicht wahrscheinlich ist.

Die durchgeführte 5'RACE diente der Verlängerung der *BKT*-Sequenz in 5'Richtung, ein wichtiger Schritt, um die Sequenz der vollständigen cDNA zu erhalten. Die Klonierung und anschließende Sequenzierung der Nukleotidsequenzen (maximal 1,5 kb) ergab das Vorhandensein voneinander unabhängiger Klone, da diese alle eine unterschiedliche Verlängerung der *BKT*-Sequenz aufwiesen. Auffällig ist die hohe Homologie der erhaltenen Klone untereinander, abgesehen von der Intron-Exon-Struktur des B5-Klones, die in den anderen Klonen nicht gefunden werden konnte. Diese Sequenz wird von den Intron/Exon-Splice-Sites GT-CAG flankiert und ist in diesem Bereich auf Proteinebene in der NCBI-Datenbank unbekannt (keine Orthologie zu *H. pluvialis* oder *M. zofingiensis*). Die Intron/Exon-Grenzen sind in höheren Pflanzen stark konserviert (Brown, 1989). In *M. zofingiensis* wurden in der Sequenz der *BKT* drei, in *H. pluvialis* fünf Introns identifiziert, welches dieselben Splice-Sites aufwiesen (Huang et al., 2006b). Die Position dieser Introns ist aber weder zwischen *H. pluvialis* und *M. zofingiensis* noch zwischen *S. producto capitatus* und diesen beiden Grünalgen konserviert.

Der längste Klon (6013) enthielt eine Sequenzverlängerung um 788 Nukleotide (262 AS) ausgehend vom konservierten Histidin-Motiv der *BKT*. Das offene Leseraster der Aminosäure-Sequenz ist 258 AS lang, und befindet sich damit bereits im Bereich der *BKT* aus *Chlorella zofingiensis* (ORF 312 AS). Verschiedene Faktoren sprechen dafür, dass hier das 5'Ende des *BKT*-Gens gefunden wurde: das erste Startcodon (ATG) befindet sich 146 Nukleotide in 3'-Richtung versetzt, hierbei könnte es sich um die 5'-untranslatierte Region des Gens handeln. Acht AS vor diesem Startcodon befindet sich ein Stoppcodon (TAA), die Sequenz dazwischen enthält ein AG, welches jedoch auch das Ende eines weiteren potenziellen Introns darstellen könnte. Diese Sequenz entspricht jedoch nicht der CAG-Konsensus-Sequenz. Das Vorhandensein einer weiteren Exon-Intron-Border ist auch deshalb nicht wahrscheinlich, da nur in einem von neun RACE-Klonen ein Intron enthalten war. Da cDNA meist keine Introns

enthält, sollte dieses Intron aus der Mehrzahl der Klone durch Spleißen entfernt worden sein. Darüber hinaus konnte mit entsprechender Software keine weiteren Introns in den Sequenzen identifiziert werden. Die hohe Homologie der Klone spricht eher für die Identifizierung des Startcodons und damit für das 5' Ende des *BKT*-Gens.

Die mRNA der *BKT* aus *Chlorella zofingiensis* durch Huang et al. (2006b) wies eine Sequenzlänge von ca. 2 kb auf (AC Nr. AY772714), d.h., die klonierte *BKT*-Sequenz aus *S. producto capitatus* liegt mit 1,5 kb in einem relevanten Größenbereich, ist aber in 3'-Richtung noch unvollständig.

In der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz (Mastersequenz nach Vergleich der Abweichungen aller Klone) konnten alle drei konservierten Histidin-Cluster-Motive (einmal HX3H und zweimal HX2HH, (Fraser et al., 1997)) identifiziert werden. Die Histidinreste sind für die Bindung des Fe²⁺-Cofaktors in membrangebundenen Enzymen notwendig, eine Struktur, die auch in Fettsäure-Desaturasen gefunden wurde (Heinz, 1993). Die zusammengesetzte Aminosäure-Sequenz aus Klon 6013 und H12 (insgesamt 361 AS) wurde auf Proteinmodifikationen untersucht, ergab jedoch keine Vorhersagen für z.B. eine Myristylierungsstelle. Für eine genauere Proteinstruktur-Analyse sollte zunächst die vollständige Aminosäure-Sequenz vorliegen.

Die Klonierung von cDNA mittels RT-PCR aus RNA, welche aus Biomasse isoliert wurde, die 14 Tage unter Stressbedingungen kultiviert wurde, deutet darauf hin, dass das *BKT*-Gen in *S. producto capitatus* unter Stressbedingungen exprimiert wird. Erste Northern-Analysen zeigen eine starke Expression der *BKT* direkt nach Exposition der Stressbedingungen (6 h nach Einsetzen von Starklicht und Nährstoffmangel). Unter der Annahme, dass in grünem Gewebe keine Exprimierung der *BKT* erfolgt, da hier kein Ax gebildet wird, könnte das Ergebnis auf ein sehr früh induziertes Gen hinweisen, dessen Transkription nur transient erfolgt. Nach 9 bzw. 12 Tagen wurde wieder eine äußerst schwache Transkriptakkumulation gemessen. Sollte dieser Nachweis spezifisch sein, muss der Grund für die zwischenzeitliche Abnahme der Expression noch untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Expressionsanalysen mit *S. producto capitatus* wiederholt werden, um eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine mögliche frühe Exprimierung der *BKT* in *S. producto capitatus* würde der gemessenen Expression der *CRTZ* in *H. pluvialis* entsprechen, deren mRNA 8h nach Einsetzen der Stressbedingungen (Starklicht) hochreguliert wurde und deren Expression nach zwei Tagen bereits nicht mehr nachweisbar war (Steinbrenner und Linden, 2001). Trotz stetig steigender Ax-Konzentration wurde ein Anstieg des Transkriptionsproduktes der *BKT* nur transient gemessen.

sen. Grünewald et al. (2000) konnten jedoch die mRNA der *BKT* erst nach 2 Tagen unter Stressbedingungen nachweisen, ein Rückgang der mRNA-Menge war dementsprechend erst nach 5 Tagen messbar. Ein Grund hierfür könnten die verwendeten Stressbedingungen sein, die zwischen den Versuchen nicht vergleichbar sind. Aufgrund einer 5%igen Restkonzentration Nitrat im Medium waren die Stressbedingungen bei Grünewald et al. (2000) schwächer ausgeprägt als bei Steinbrenner und Linden (2001), was die verspätet einsetzende Ax-Biosynthese zur Folge haben könnte. Die Hochregulierung der *BKT* in *H. pluvialis* als Reaktion auf Stressbedingungen wurde ebenfalls von Vidhyavathi et al. (2007) beschrieben, darüber hinaus erfolgte eine Herunterregulierung der Transkription nach dem Wechsel in ideale Wachstumsbedingungen. Der Anstieg der PDS-Proteinkonzentration und der mRNA-Gehalte nach der Induktion der CarBS in *Synechococcus* deutet darauf hin, dass die PDS ebenfalls transkriptionell reguliert ist (Schafer et al., 2006). Die Ergebnisse der Regulation der Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* (Steinbrenner, 2006) sowie die Resultate aus der vorliegenden Arbeit mit *S. producto capitatus* weisen darauf hin, dass die transkriptionelle Regulation der SC-Biosynthese-Gene in der Stressantwort der Mikroalgen auf ungünstige Umweltbedingungen eine wichtige Rolle spielt.

Dass β -Carotin, als primäres Carotinoid, die Vorstufe der Ax-Biosynthese darstellt, ist in der Literatur unumstritten (Fraser und Bramley, 2004), der anschließende Weg der Ax-BS wird jedoch von den Autoren kontrovers diskutiert. Die in *S. rubescens* detektierten Intermediate der SC-BS und die sich daraus ergebenden möglichen Biosynthesewege für Ax sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

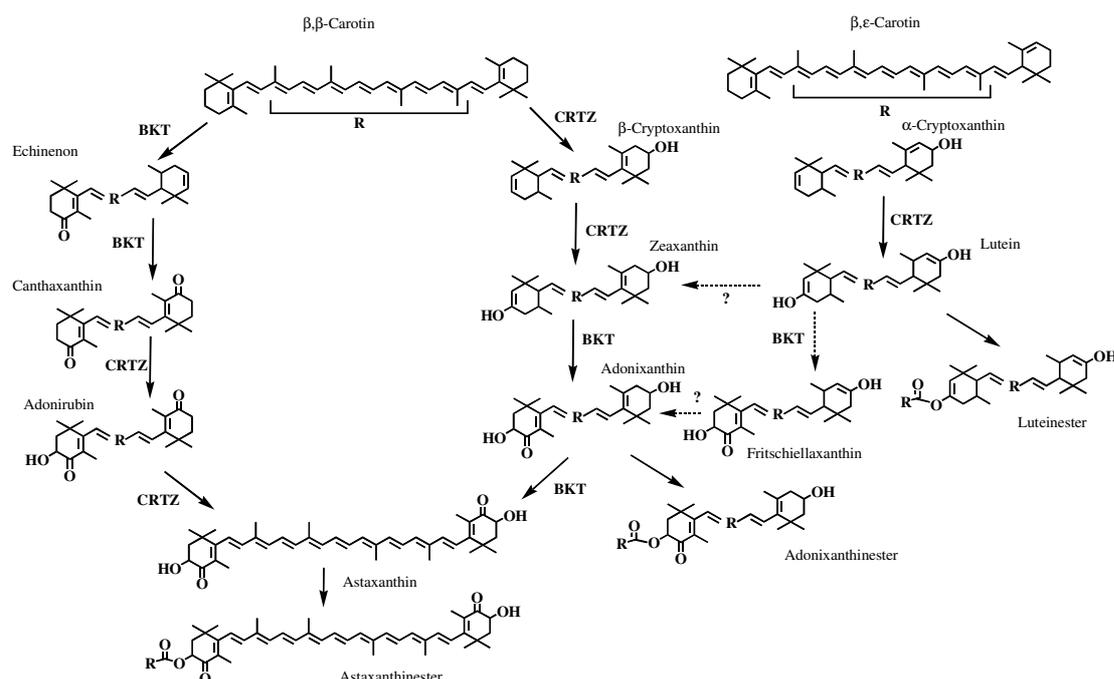


Abbildung 38 : im Rahmen der Arbeit nachgewiesene Ax-Biosynthese-Intermediate in *S. rubescens* (durchgezogene Pfeile), möglicher Biosyntheseweg (gestrichelter Pfeil); R: Fettsäure

Die Bildung von Adonixanthin in hohen Gehalten in *S. rubescens* und allen anderen untersuchten Mikroalgen weist darauf hin, dass Ax über Zeaxanthin gebildet wird. Dieser Weg wurde bereits für *Chlorella zofingiensis* (Huang et al., 2006b) und für *Chlorococcum* sp. (Yuan et al., 2002) vorgeschlagen. Zusätzlich konnte jedoch auch Cx in hohen Gehalten detektiert werden, sodass ein zweiter Biosyntheseweg über Echinenon, Cx und Adonirubin sehr wahrscheinlich ist. Dieser BS-Weg wurde für *H. pluvialis* von verschiedenen Autoren vorgeschlagen (Grung et al., 1992, Fan et al., 1995).

Neben Cx wurde in einer Mehrzahl der untersuchten Grünalgen sowohl Lutein als auch β -Carotin in Gehalten gefunden, die mit den Ax-Gehalten vergleichbar waren. Für β -Carotin kann diese Tatsache damit begründet werden, dass es den Ausgangspunkt der Ax-BS darstellt. Für Lutein erscheint dieser Sachverhalt interessant, da Lutein nicht als Vorstufe für die Sekundär-carotinoid-Biosynthese angesehen wird und daher wie die anderen primären Carotinoide Neoxanthin und Violaxanthin kontinuierlich abgebaut werden müsste. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass Lutein als sekundäres Carotinoid als Intermediat in der Ax-Biosynthese auftritt. Die Luteinkonzentration nimmt während der Stressexposition in *S. rubescens* nicht wie erwartet, wie die der PC ab, sondern verhält sich ähnlich wie Gehalte der sekundären Carotinoide bzw. die des β -Carotins. Ähnlich hohe Gehalte an Lutein (doppelt so hoch wie Ax) wurden ebenfalls von DelCampo et al. (2004) in *Chlorella zofingiensis* gefunden. Die Klassifizierung als primäres Carotinoid ist aufgrund dieser Beobachtungen fraglich. Es kommt als Vorstufe für die Ax-Biosynthese in Frage. Da Lutein aber nicht durch die Einführung zweier Ketogruppen direkt in Ax umgewandelt werden kann, müsste zunächst eine Isomerisierung in Zeaxanthin erfolgen, anschließend wäre eine Umwandlung über Adonixanthin in Ax möglich. Eine Umwandlung des Luteins in Fritschiellaxanthin und anschließende Isomerisierung in Adonixanthin ist ebenfalls denkbar, und würde die Daten von (Burczyk, 1987) aus *S. obliquus* erklären, der Fritschiellaxanthin nachgewiesen hat. Eine weitere Beobachtung spricht für die Hypothese, dass Lutein in die Ax-BS einbezogen ist: die Detektion von Luteinestern in stressexponierten Grünalgen. Die Ax-BS verläuft im Cytosol, wo auch die Synthese der Monoester stattfindet (Wang et al., 2003). Hierfür wird β -Carotin aus den Chloroplasten über Carotinoid-bindende Transportproteine ins Cytosol exportiert (Grünwald und Hagen, 2001). Da Lutein als primäres Carotinoid unverestert in den LHCs des Chloroplasten lokalisiert ist (Dall'Osto et al., 2006) und Luteinester in dieser Arbeit bzw. in der Literatur in grünen Zellen nicht nachgewiesen werden konnten, ist die Detektion der Luteinester nach Stressexposition in *S. rubescens* und in *H. pluvialis* überraschend. Neben den Luteinestern

traten nur Fettsäureester sekundärer Carotinoide wie Adonixanthin, Adonirubin und Ax auf. Die Luteinester-Biosynthese müsste analog zu den anderen detektierten veresterten SC in den Lipidvesikeln im Cytosol stattfinden. Sowohl die hohen Gehalte als auch die Präsenz von Luteinestern in stressexponierten Zellen von *S. rubescens* und *H. pluvialis* deuten darauf hin, dass Lutein zu diesem Zeitpunkt ein sekundäres und kein primäres Carotinoid ist.

Dass *in vivo* eine derartige Vielzahl von Carotinoiden auf dem Weg zur Ax-Biosynthese entstehen können, wird erst durch die breite Substratspezifität der CRTZ und BKT ermöglicht. Beide akzeptieren sowohl β -Carotin als Substrat, als auch die Endprodukte des jeweils anderen Enzyms (Fraser et al., 1997). Die starke Akkumulation von Cx in den untersuchten Grünalgen lässt jedoch vermuten, dass dessen Umwandlung in Adonixanthin bzw. in Ax durch die CRTZ nicht effizient stattfindet. Im Fall der Umwandlung von Adonixanthin zu Ax durch die BKT verhält es sich ähnlich. In *Chlorella zofingiensis* wurde nachgewiesen, dass die BKT auch Substrate umwandelt, die bereits zuvor von der CRTZ hydroxyliert wurden (Huang et al., 2006b), hieraus resultiert die Bildung von Ax über Adonixanthin. In *H. pluvialis* ist diese Funktion der BKT sehr schwach ausgeprägt (Lotan und Hirschberg, 1995), was den geringen Anteil an Adonixanthin erklären würde. In *Nostoc punctiforme* wurde jedoch ebenfalls eine Umwandlung von Zeaxanthin in Ax durch die BKT gezeigt (Steiger und Sandmann, 2004). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in *Chlorella zofingiensis* erhalten, auch hier wird die effiziente Umwandlung von Zeaxanthin in Adonixanthin und Ax beschrieben (Huang et al., 2006b). Diese Untersuchungen erklären jedoch nicht, warum Adonixanthin als Zwischenprodukt akkumuliert, eine effiziente Umwandlung würde nur das Endprodukt Ax vermuten lassen. Die Aktivität der CRTZ ist ebenfalls in den verschiedenen Mikroalgenarten unterschiedlich ausgeprägt. In *H. pluvialis* kann die CRTZ Ax über Cx bilden (Linden, 1999), während die CRTZ im Cyanobakterium *Synechococcus* diese Reaktion nicht katalysierte (Albrecht et al., 2001). Die Enzymaktivitäten bzw. das Substratspektrum der Enzyme der Sekundärcarotinoid-Biosynthese scheinen artabhängig zu sein. Aus dem Carotinoidspektrum, welches in den untersuchten *Scenedesmus* sp. akkumuliert, kann geschlossen werden, dass beide Enzyme, BKT als auch die CRTZ, sowohl β -Carotin als auch die oxygenierten bzw. hydroxylierten Carotinoidvorstufen auf dem Ax-Biosyntheseweg als Substrate akzeptieren. Diese Annahme wird von Huang et al. (2006b) in *Chlorella zofingiensis* mit Hilfe von funktioneller Analyse der BKT in *E. coli* untermauert. Die genetisch verwandten Chlorophyceae *Chlorella* und *Scenedesmus* akkumulieren sowohl Cx als auch Adonixanthin als Intermediate der Ax-Biosynthese. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Ye et al. (2007) wurde dokumen-

tiert, dass die Anzahl der Kopien der SC-Biosynthese-Gene *CRTZ* und *BKT* in einem Plasmid-Konstrukt in einem transgenen *Methylomonas*-Stamm die Zusammensetzung des Carotinoidspektrums maßgeblich beeinflusste. Demnach resultierten zwei *CRTZ* und eine *BKT* in der Akkumulation von Adonixanthin, während zwei *BKT* und eine *CRTZ* zur Akkumulation von Cx und Adonirubin führten. Erst das Vorhandensein von zwei *BKT*- und zwei *CRTZ*-Genen resultierte in der Akkumulation von Ax als Hauptcarotinoid. Es sollte nun die Anzahl der Carotinoid-Biosynthese-Gene in *H. pluvialis* und *Scenedesmus* sp. überprüft werden, um diesen Zusammenhang auch in Mikroalgen nachweisen zu können.

Die intrazellulär gebildeten Carotinoide liegen mit langkettigen Fettsäuren (C16-C20) verestert vor, Substanzen, die der Zelle u.a. als Energiespeicher dienen oder integraler Bestandteil von Membranen sind. Obwohl in *H. pluvialis* als auch in *S. rubescens* neben Ax auch weitere SC-Ester detektiert wurden, stellt Ax als Endprodukt der SC-Biosynthese den größten Anteil an der Carotinoid-Esterfraktion. Diese Beobachtung wäre mit dem „Substrat-Channeling“ zu erklären, welches in Multienzymkomplexen auftritt: zunächst läuft die mehr oder weniger in Richtung Ax gerichtete Biosynthese ab, und im Anschluss erfolgt die Veresterung mit Fettsäuren, die in den Lipidglobuli gespeichert sind. Im Fall von *H. pluvialis* erfolgt eine sehr effiziente Umwandlung aller Carotinoid-Vorstufen in Ax sowie anschließend eine fast vollständige Veresterung (Monoester). Abhängig vom Medium werden aber nur 15-20% der Monoester in Diester überführt. Die Ax-ME weisen jedoch bereits eine höhere Löslichkeit in Öl auf, als freies Ax (Rao et al., 2007) und damit eine höhere Speicherkapazität in den Lipidglobuli der Zelle.

Die unter Stressbedingungen beobachtete, verstärkt auftretende Fettsäuresynthese (Schoefs et al., 2001) lässt sich z.T. damit erklären, dass die photosynthetische Aktivität trotz Reduktion erhalten bleibt (Chlorophyllgehalt erst nach 46 Tagen gleich null). Die photosynthetische Kohlenstoff-Fixierung findet weiterhin statt, die Neusynthese von N-haltigen Verbindungen wie Proteinen und Nukleinsäuren kann jedoch aufgrund des Stickstoffmangels nicht fortgesetzt werden. Ein Weg, die Photosyntheseenergie zu speichern, ist die Synthese von N-freien Speicherstoffen wie Fettsäuren (Richardson et al., 1969) und Carotinoiden.

H. pluvialis, der aufgrund seiner hohen Ax-Gehalte in der vorliegenden Arbeit mit *S. rubescens* vergleichend untersucht wurde, ist mit der Gattung *Scenedesmus* (Familie: Scenedesma-ceae, Ordnung: Chlorococcales) nicht eng verwandt. Der Biflagellat gehört zur Familie der Haematococcaceae (Ordnung: Volvocales), und steht daher den Chlamydomonadaceae (Ordnung: Volvocales, z.B. *Chlamydomonas nivalis*) und den Dunaliellaceae (Ordnung: Volvocales, z.B. *Dunaliella salina*) näher. Sowohl *Dunaliella* als auch *Chlamydomonas* akkumulieren

große Mengen SC: β -Carotin (Borowitzka et al., 1984) bzw. Ax-Ester (Remias und Lütz, 2007). In *Chlamydomonas nivalis* wurde, neben Spuren von Echinenon, jedoch kein Cx detektiert (Remias et al., 2005). MS-Analysen identifizierten in dieser Spezies des Weiteren einen Ax-diglucosid-fettsäurediester ($[(\text{di-6-O-oleoyl-}\beta\text{-D-glucopyranosyloxy})\text{-Ax}]$), die Ölsäure war auch eine der Hauptfettsäuren der Ax-Ester in *H. pluvialis* dieser Arbeit. Obwohl sehr häufig Ax das Endprodukt der SC-BS ist, scheinen bereits in enger verwandten Spezies unterschiedliche Biosynthesewege zu existieren. Die hier untersuchten Spezies der Ordnung Chlorococcales hingegen unterschieden sich nicht wesentlich im gebildeten SC-Spektrum. Dennoch sind weitere Arbeiten zur Ax-Biosynthese nötig, v.a. in Gattungen, die weniger intensiv untersucht worden sind, als *Haematococcus*.

4.6 Steigerung der Ax-Ausbeute in *S. rubescens* und *S. producto capitatus*

Zur Induktion der Ax-Biosynthese in Mikroalgen wird meist ein Teil der Kultur in ein Nitratmangelmedium überführt (entspricht meist dem Wachstumsmedium ohne Nitrat) und die Beleuchtungsintensität wird von ca. 50 auf 150 bis 460 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ erhöht (Hanagata und Dubinsky, 1999, Masojidek et al., 2000, Del Campo et al., 2004). Ein im Rahmen von Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Griehl entwickeltes Stressmedium (SS) wurde im Folgenden als Basismedium eingesetzt, um den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Ax-Biosynthese zu untersuchen.

In ihrer natürlichen Umgebung sind sowohl Mikro- als auch Makroalgen häufig innerhalb kurzer Zeit dem Einwirken unterschiedlichster Stressfaktoren gleichzeitig ausgesetzt. Bei Austrocknung z.B. seichter Gewässer ändert sich neben Salzgehalt, Lichtintensität, Temperatur und Wassermenge vor allem die Lichtintensität im Bereich von 1-2 Größenordnungen (Falkowski und Raven, 1997). Hohe Lichtintensitäten, die bei der Induktion der Ax-Biosynthese in Chlorophyceen, Eustigmatophyceen und Cyanophyceen eine entscheidende Rolle spielen, sind für die Ökophysiologie der Mikroalgen entscheidend. Sie regen bis zu einem bestimmten Grenzwert neben gesteigertem Wachstum und der SC-Biosynthese auch die Produktion weiterer Substanzen, wie z.B. Glykolsäure in *Chlorella pyrenoidosa* (Tolbert und Zill, 1956) und starklicht-induzierbare Proteine in Cyanophyceen (He et al., 2001), an.

Licht wird hierbei als positiver Einflussfaktor auf die Ax-Biosynthese in Mikroalgen angesehen (Bhosale, 2004, Brinda et al., 2004). Ausgehend von einer Lichtintensität von 110 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ergab die Variation der Lichtintensität bei sonst identischen Kulturbedingungen eine Abhängigkeit der SC-Bildung von der Lichtintensität in *S. rubescens*, wobei der SC-Gehalt

bei $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ maximal war. Diese Steigerung der massebezogenen Carotinoid-Ausbeute ($\text{mg}/\text{g TS}$) könnte auf einen Anstieg der Enzymaktivität zurückgehen. Darüber hinaus kann eine Erhöhung der Lichtintensität ein gesteigertes phototrophes Wachstum der Mikroalgen bewirken und damit die volumenbezogene Ausbeute an Carotinoiden steigern (Fabregas et al., 2003). Das Wachstum der Mikroalgen im Stressmedium und damit eine Produktivitätssteigerung konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden. Ein weiterer Mechanismus wird in der Stimulation der Entstehung freier Sauerstoffradikale durch hohe Lichtintensitäten gesehen (Rmiki et al., 1999), die dann wiederum die Bildung der Sekundärcarotinoide anregen (Ip und Chen, 2005a). Die Reduktion von oxidativem Stress *in vivo* und *in vitro* ist v.a. für Ax seit längerem beschrieben (Barros et al., 2001). Die Untersuchung der Genexpression von vier Carotinoid-Biosynthese-Genen in *H. pluvialis* (*LCY*, *PSY*, *PDS* und *CRT-Z*) ergab, dass die Transkriptionlevel als Ergebnis gesteigerter Lichtintensitäten ansteigen (Steinbrenner und Linden, 2003). Zu hohe und zu geringe Lichtintensitäten führten zu reduzierten Ausbeuten in *S. rubescens*, ein Phänomen, welches aus *H. pluvialis* bereits bekannt ist (Kobayashi et al., 1992, Park und Lee, 2001).

In *H. pluvialis* konnte die Stimulierung der Ax-Biosynthese durch Steigerung der Lichtintensität von 68 auf $281 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ innerhalb der ersten 6 Tage gezeigt werden, wobei bei $281 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ die Carotinoidausbeute nach 8 Tagen bereits unterhalb des Ausgangsgehaltes lag (Kobayashi et al., 1992). Dieser Effekt geht wahrscheinlich auf eine Schädigung der Zellen durch die hohen Lichtintensitäten zurück, wobei die tolerierbaren Werte Spezies-abhängig zu sein scheinen. In *S. rubescens* konnte dieser Rückgang der Carotinoidausbeute ab einer Lichtintensität von $525 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ beobachtet werden. Eine Steigerung der Carotinoidausbeuten für *H. pluvialis* wurde von verschiedenen Autoren gefunden, wobei sich die ermittelten optimalen PFDs in identischen Stämmen z.T. erheblich voneinander unterschieden: $248 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Kobayashi et al., 1992), $160 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Park und Lee, 2001), $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Boussiba et al., 1992) und $1550\text{-}1600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Harker et al., 1995). Diese Abweichungen der Resultate gehen wahrscheinlich u.a. darauf zurück, dass Reaktorgeometrien, Medienzusammensetzungen und die Methode der Lichtintensitätsmessungen nicht übereinstimmen und daher nicht vergleichbar sind.

Eine Steigerung der Carotinoidgehalte bei höheren Lichtintensitäten wurde ebenfalls für *Muriellopsis* sp. (Del Campo et al., 2000), *Spirulina platensis* (Liu, 1984) und *Dunaliella salina* (Orset und Young, 2000) berichtet. Dieser Effekt tritt also neben Chlorophyceen auch in Cyanophyceen auf, den beiden Algenklassen, die für ihre Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen bekannt sind (Fogg, 1969). Die Carotinoidzusammensetzung blieb von den

variierenden Lichtintensitäten weitgehend unbeeinflusst, eine Beobachtung, die mit der von Bhosale (2004) übereinstimmt. Durch den Kultivierungsparameter Licht wird also nicht die Ax-Biosynthese angeregt, sondern die Sekundärkarotinoid-Biosynthese insgesamt.

Neben der Beleuchtungsintensität spielt die Beleuchtungsdauer ebenfalls eine Rolle in der Ax-Biosynthese. Eine kontinuierliche Beleuchtung hatte sich bei Untersuchungen mit *H. pluvialis* in Bezug auf den Ax-Gehalt effektiver als ein Beleuchtungsrhythmus (Tag/Nacht) herausgestellt (Kobayashi et al., 1992), und wurde daher hier angewendet.

Der Lichteintrag in Photobioreaktoren ist vor allem deshalb kritisch, weil Licht kein speicherbarer Rohstoff ist (vgl. Medienbestandteile) und es deshalb leicht zu Limitationen kommt. Er wird durch den Reaktordurchmesser und die Zellkonzentration im Medium begrenzt (Pulz, 2001).

Neben der Lichtquantität hat ebenfalls die spektrale Zusammensetzung des emittierten Lichtes einen Einfluss auf die SC-Biosynthese in Mikroalgen. In *S. rubescens* wurden die Carotinoidgehalte in der Stressphase durch die Verwendung von UV-A-Licht (380 nm) im Vergleich zu blauem Licht und Tageslicht gesteigert. Dieser Effekt wurde von verschiedenen Autoren ebenfalls für *H. pluvialis* gezeigt, Licht kürzerer Wellenlängen (violett/ blau) regte die Ax-Akkumulation an (Kobayashi et al., 1992, Park und Lee, 2001, Katsuda et al., 2004). Die gesteigerte Akkumulation von SC und der Abbau von Chlorophyll a nach UV-B Bestrahlung trat ebenfalls in *Tetraselmis* sp., einer marinen Grünalge, auf (Goes et al., 1994). Die Induzierung der SC-Biosynthese durch blaues Licht wurde neben Grünalgen auch in den Pilzen *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1988), *Phycomyces blakesleeanus* (Bejarano et al., 1991), *Neurospora crassa* (Nelson et al., 1989) beschrieben. Diese Reaktion könnte auf das Vorhandensein von Blaulichtrezeptoren wie z.B. Cryptochromen und Phototropin hindeuten, welche die SC-Biosynthese über die Genregulation stimulieren könnten und deren Existenz in Algen, Pflanzen und Pilzen beschrieben wurde (Cashmore et al., 1999). Wie auch bei der gesteigerten Lichtintensität wurde keine spezifische Steigerung des Ax-Gehaltes erzielt.

Das Zellwachstum hingegen wurde sowohl durch Blaulicht als auch durch UV-Licht durch die energiereiche Strahlung in *S. rubescens* inhibiert, ein Ergebnis, welches ebenfalls in *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben wurde (Hessen et al., 2001). Das Wachstum unter weißem Licht entspricht vollständig der photosynthetisch aktiven Strahlung und erzielt daher die höchsten Biomasseausbeuten. Der in *S. rubescens* beobachtete Rückgang der Biomassekonzentration unter Verwendung der UV-Strahlung geht daher wahrscheinlich auf die Schädigung von Zellbestandteilen durch entstandene ROS zurück, die Oxidationsschäden u.a. an

Nukleinsäuren und Membranen verursachen. Die Steigerung der Carotinoidproduktivität ist durch diese Kultivierungsstrategie daher nicht zu erzielen.

Die Wirkung einzelner Nährstoffmangelzustände auf die Ax-Biosynthese in *S. rubescens* sollte ebenso untersucht werden wie der Einfluss von NaCl und KCl. Es waren signifikante Einflüsse auf den Metabolismus zu erwarten, da Phosphat für den Energiehaushalt der Zellen eine wichtige Rolle spielt, während Nitrat als einzige Stickstoffquelle die Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren sicherstellt. In *S. rubescens* konnte gezeigt werden, dass der Nitratmangel unter Starklicht einen stärkeren Einfluss auf die Ausbeute an Ax und SC hatte als der Phosphatmangel. Borowitzka (1991) fand in *H. pluvialis* in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis, dass Nitratmangel in Kombination mit einer Phosphatquelle zu besseren Ax-Ausbeuten führt. Von He et al. (2007) wurde ebenfalls kein signifikanter Einfluss des Phosphatmangels auf den Ax-Gehalt in *H. pluvialis* ermittelt. Boussiba und Vonshak (1991) publizierten jedoch den gegenteiligen Effekt, dass Phosphatmangel in Kombination mit einer Nitratquelle im Medium für die Ax-Biosynthese in *H. pluvialis* entscheidend sei. Da unter Nitratmangel und Starklicht in *H. pluvialis* die Proteingehalte aufgrund gesteigerter Endopeptidase-Aktivitäten absinken, wurde von Dong (2007) postuliert, dass die Proteine als C-Quelle für die Ax-BS fungieren könnten. Dies könnte die höheren SC-Gehalte erklären.

Die Kombination beider Limitationen steigerte die Ax-Gehalte in *S. rubescens* im Vergleich zu den einzelnen Mangelmedien, ein Ergebnis welches mit den Untersuchungen von Brinda et al. (2004) in *H. pluvialis* übereinstimmt. Der isoosmotische Ausgleich des Nährsalzmangels mit KCl erzielte keine Steigerungen der Carotinoidgehalte, was darauf hindeutet, dass die Induktion der SC-Biosynthese nicht direkt mit osmotischem Stress gekoppelt ist.

Der Einfluss von Salz auf die Physiologie der Mikroalgen ist vielschichtig. Die zusätzliche Verwendung von 69 mM NaCl im Stressmedium (NO_3^- und PO_4^{3-} -Mangel) in *S. rubescens* zeigte eine signifikante Ausbeutesteigerung an Ax und SC. Die dennoch geringe Steigerung lässt sich eventuell auf die vergleichsweise niedrige NaCl-Konzentration zurückführen. Fedina und Benderliev (2000) verwendeten 175 mM NaCl zur Erzeugung von Salzstress in *S. incrassatulus*. Für die Ax-Akkumulation in *H. pluvialis* wurde von Cifuentes et al. (2003) 138 mM NaCl als optimal bestimmt, während niedrigere Konzentrationen (40 mM) keinen positiven Effekt auf die Ax-Akkumulation hatten. Gleichzeitig war jedoch mit steigenden Salzkonzentrationen eine verstärkte Zellmortalität zu beobachten, da die Halotoleranz in *H. pluvialis* sehr gering ist (≤ 172 mM (Borowitzka et al., 1991)). Weiterhin wurde für den SC-Gehalt in *Chlorococcum* sp. eine optimale NaCl-Konzentration von 170 mM ermittelt (Liu et al., 2000). Aus diesem Grund sollte die Verwendung eines künstlichen Meersalzes mit einer NaCl-

Konzentration von 569 mM die Frage klären, wie hoch die Halotoleranz von *S. rubescens* ist und inwieweit sich diese auf die SC-Biosynthese auswirkt. Diese vergleichsweise hohe Salzkonzentration ist auch in Bezug auf ein biotechnologisches Produktionsverfahren interessant, da diese Kontaminationsrisiken in unsteriler Prozessführung minimiert (Bsp. β -Carotin-Produktion mit der halophilen Grünalge *D. salina*). Die Halotoleranz von *Scenedesmus* sp. wurde von Kessler (1977) untersucht und, wie in *H. pluvialis*, als gering eingestuft (≤ 172 mM NaCl). Das Wachstum, welches mit *S. rubescens* im Meersalzmedium (569 mM NaCl) noch gemessen wurde, lässt jedoch eine Klassifizierung dieser Spezies als halotolerante Alge zu (Ben-Amotz und Grunwald, 1981). Die Steigerung der Ausbeute an Carotinoiden von 8,89 mg/ g TS auf 12,96 mg/ g TS zeigt deutlich den positiven Einfluss der vergleichsweise hohen NaCl-Konzentration. Stress entsteht hier für die Süßwasseralge daher, da die osmotische Balance zwischen Zelle und Medium gestört, der Wasseraustritt und der Eintritt von Na^+ und Cl^- -Ionen begünstigt wird und hierdurch Ionen-toxische Effekte entstehen. Die Anpassungsmechanismen in Grünalgen beinhalten v.a. die Veränderung der Ionenaufnahme (K^+ -Aufnahme, Na^+ -Abgabe), die Bildung von kompatiblen Soluten wie z.B. Glycerol in *Dunaliella* (Sadka et al., 1989, Borowitzka und Siva, 2007) und Prolin in *S. incrassatulus* (Fedina und Benderliev, 2000) sowie die Synthese von Stressproteinen (Erdmann und Hagemann, 2001). Im Fall der Zellwand-losen Grünalge *Dunaliella* bedeutet diese Adaption eine Salztoleranz von 0,05 bis 5,5 M NaCl. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Veränderung der Zellwand-Membranpermeabilität durch die Erhöhung des Anteils polyungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden (Singh et al., 2002). Der Einfluss des Salzstresses auf die Ax-Biosynthese ist hierbei in der Literatur noch ungeklärt, nur der negative Effekt auf das Zellwachstum wurde berichtet (Del Campo et al., 2004). Der Teilungsstopp der Zellen wurde von verschiedenen Autoren als Voraussetzung für die Ax-BS beschrieben (Boussiba und Vonshak, 1991, Fabregas et al., 2003, He et al., 2007) und scheint die einzige dokumentierte Verbindung zur Ax-BS darzustellen.

Pelah et al. (2004) fanden jedoch unter Verwendung von NaCl einen wichtigen Einfluss auf die SC-Biosynthese: der Salzstress konnte in Kombination mit Nitratmangel die SC-Biosynthese in *Chlorella zofingiensis* auch unter Schwachlichtbedingungen induzieren. Dass die Ax-Biosynthese in *S. rubescens* auch bei niedrigen Lichtintensitäten ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) möglich ist, konnte im Rahmen der Versuche ebenfalls festgestellt werden. Hier war NaCl der Faktor, der, in Kombination mit Nitratmangel, die Ax-BS in *S. rubescens* induzierte. Ein weiteres Beispiel für die Carotinoidproduktion unter Salzstress ist die halotolerante Alge *Dunaliella salina*, die β -Carotin in flüssigen Medien mit bis zu 5,85 M NaCl produziert (El Baz et al., 2002). Auch

in *H. pluvialis* wurde eine Induktion der Ax-BS im Dunkeln auf einem Acetat-Medium durch geringe NaCl-Konzentrationen (17 mM) publiziert (Kobayashi et al., 1997b).

Hier wird deutlich, dass einzelne Einflussfaktoren, in diesem Fall die Lichtintensität, keine zwingend erforderlichen Charakter aufweisen, ihre Variation aber Einfluss auf den Akkumulationsprozess hat. NaCl scheint auf die Ax-BS unabhängig vom Lichtstress einen positiven Effekt aufzuweisen. Da ansteigende Salzkonzentrationen in der Natur eine verringerte Verfügbarkeit von Wasser bedeuten (Zhu, 2002), könnte der Zusammenhang zur Ax-BS hierüber bestehen. Das Austrocknen in Form von Verdunstung oder dem Einfrieren von Wasser verursacht verschiedene Arten von Stress, wie z.B. Nährstoffmangel, Anstieg der Lichtintensität, der Temperatur etc., alles Faktoren die dafür bekannt sind, die Ax-Biosynthese zu beeinflussen (vgl. Tabelle 2 S.13). Dass das Austrocknen einen positiven Einfluss auf die SC-Bildung in Algen hat wurde für *Scenedesmus* von (Hanagata und Dubinsky, 1999) und für *Chlamydomonas* von (Bidigare et al., 1993) bereits beschrieben. Diese Hypothese wird durch die Daten von Kobayashi et al. (1997a) gestützt, welche die Ax-Ausbeute in *H. pluvialis* durch den Einsatz von Abscisinsäure (ABA), einem Phytohormon welches bei Trocken- und osmotischem Stress den Wasserhaushalt reguliert, gesteigert wurde. Die Akkumulierung von ABA führt über einen Phospholipid-Signaltransduktionsweg zu einer veränderten Genexpression in Pflanzen und Algen, und könnte so auch einen Einfluss auf die Ax-Biosynthese haben.

Um die Ax-Ausbeuten in *S. rubescens* weiter zu steigern, wurden verschiedene mögliche Biosynthesestufen des Isoprens in das Stressmedium gegeben. IDP und höhere Stufen der Carotinoid-Biosynthese (z.B. GDP, GGDP) sind für einen derartigen Versuch nicht geeignet, da die Löslichkeit in wässrigen Medien stark begrenzt bzw. nicht gegeben ist.

Da der MEP-Weg zur Biosynthese des IDPs erst verhältnismäßig spät entdeckt wurde (Schwender et al., 1996), gibt es in *H. pluvialis* nur wenige und in anderen carotinoidproduzierenden Mikroalgen keine Untersuchungen zur Verwertung von Pyruvat und GAP. Sowohl in *S. rubescens* als auch in *S. producto capitatus* konnten durch Kultivierung mit Pyruvat übereinstimmend stimulatorische Effekte auf die SC-Gehalte beobachtet werden, die, anders als bei Acetat und Glucose, bei steigenden Konzentrationen keine adversen bzw. inhibitorischen Effekte auslösten. Diese Beobachtungen sind identisch zu denen von Kobayashi et al. (1991), der mit Pyruvat für *H. pluvialis* ebenfalls eine Steigerung der Carotinoideausbeuten verzeichnete. Die signifikante Steigerung der Ax-Gehalte in *S. rubescens* geht hierbei wahrscheinlich auf die hohe Schwankung des Gesamtcarotinoidgehaltes zurück, und sollte durch weitere Experimente überprüft werden. In *S. producto capitatus* konnte gezeigt werden, dass die Ax-Gehalte nicht signifikant vom Carotinoidgehalt abwichen.

Die Verwendung von Acetat zur Steigerung der Ax-Akkumulation in *H. pluvialis* sind im Gegensatz zu Pyruvat hinreichend bekannt (Borowitzka et al., 1991, Kobayashi et al., 1993, Choi et al., 2002, Cifuentes et al., 2003). Sowohl in *S. rubescens* als auch in *S. producto capitatus* konnte der Ax-Gehalt um das 2,2-Fache gesteigert werden. Ab Konzentrationen von ca. 30 mM wurden inhibitorische Effekte sowohl auf das Biomassewachstum als auch auf die Carotinoidgehalte verzeichnet (Hata et al., 2001). Beide Einflüsse konnten für *S. rubescens* und für *S. producto capitatus* ebenfalls beobachtet werden, hier nahmen die Carotinoidgehalte ab 45 mM Acetat wieder ab. Der stimulatorische Effekt auf verschiedene Mikroalgen wie z.B. *S. vacuolatus*, *Neochloris wimmeri* und *Scotiellopsis oocystiformis* wurde auch im Rahmen einer vergleichenden Versuchsreihe von Orosa (2001b) mit einer sehr hohen Acetatkonzentration von 100 mM gefunden. Dominguez-Bocanegra et al. (2004) erzielten mit 12 mM Acetat in einem Nitratmangelmedium mit 98 mg/ g TS den höchsten bislang publizierten Gesamtcarotinoidgehalt in *H. pluvialis*, der bislang weder in eigenen Versuchen noch in der Literatur reproduziert werden konnte. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass Acetat in moderaten Konzentrationen in allen bislang untersuchten Mikroalgen einen positiven Effekt auf die Carotinoidakkumulation hat. Alle hier während der Kultivierung verwendeten Biosynthesestufen können entweder direkt oder, im Fall von Acetat, über den Glyoxylat- und Zitronensäurezyklus in den MEP-Weg zur Bildung von IDPs eingeschleust werden. Für Acetat wurde diese Möglichkeit in der Grünalge *S. obliquus* bereits gezeigt (Rohmer, 1999). Auf diese Weise kann im Fall einer gleichbleibenden Genexpression der Enzyme und unter der Annahme, dass keine Substratsättigung vorliegt, die Konzentration an IDP erhöht und damit die Ausbeute an Carotinoiden gesteigert werden. Für eine spezifische Steigerung der Ax-Ausbeute erscheint dieser Weg jedoch generell ungeeignet. Die Steigerung der Ax-Gehalte war in jedem Experiment mit der Steigerung der Gesamtcarotinoidgehalte verbunden, eine selektive Verschiebung der Zusammensetzung in Richtung Ax konnte durch die angewendeten Kultivierungsparameter und Zusätze nicht erzielt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Ax-Biosynthese in den Grünalgen *Scenedesmus* und *H. pluvialis*. Sekundäre Carotinoide wie Ax weisen eine Reihe von für den Organismus essenziellen Funktionen auf: sie dienen als Photorezeptoren, Photoprotektoren, Hormon- und Vitaminvorstufen, Antioxidanzien sowie als Farbstoffe (Higuera-Ciapara et al., 2006). Die intensive Forschung auf dem Gebiet der gesundheitsfördernden Eigenschaften von Ax resultiert in einer steigenden Bedeutung dieser Substanz in der Nahrungs- und Futtermittelsupplementierung. Sowohl der Reinheitsanspruch (Enantiomere) als auch das Marktvolumen wird sich mit der Entdeckung und Erforschung ihrer Tumorsuppressionseigenschaften deutlich erhöhen. Aus diesem Grund wird die biotechnologische Produktion von Ax in Zukunft verstärkt mit den chemosynthetischen Produkten konkurrieren, demzufolge sind Erkenntnisse über die Ax-Biosynthese sowie deren Beeinflussung von eminenter Bedeutung.

Die Ax-Biosynthese ließ sich durch eine Reihe von Stressfaktoren in der Mehrzahl der untersuchten Mikroalgenpezies der Gattung *Scenedesmus* induzieren und kann daher als Schutzmechanismus der Organismen betrachtet werden. Die untersuchte Untergattung *Scenedesmus* war, im Gegensatz zur Untergattung *Desmodesmus*, ausnahmslos zur Ax-Biosynthese befähigt und synthetisierte eine komplexe Mischung an sekundären Carotinoiden und ihren Fettsäureestern. Die Fähigkeit zur Ax-Biosynthese erwies sich dabei als artspezifisch und hat daher keinerlei taxonomische Relevanz. Phylogenetisch eng verwandte Spezies wie z.B. *S. obliquus* und *S. rubescens* unterschieden sich deutlich sowohl im Ax- als auch im Gesamtcarotinoidgehalt. Auffällig waren hohe Gehalte an Cx und Adonixanthin, die häufig in höheren Gehalten vorkamen als Ax. Das Vorkommen von Adonixanthin in *Scenedesmus* als SC wurde bislang nur selten publiziert, die Konfiguration sollte daher ermittelt werden. Die Vielzahl der SC deutet auf eine ineffiziente Umwandlung dieser Intermediate in Ax hin, das Endprodukt der SC-Biosynthese. Die Optimierung dieser enzymatischen Reaktion bzw. das Enzym selbst könnte ein Target für die Steigerung der intrazellulären Ax-Konzentration darstellen.

Scenedesmus rubescens und *Scenedesmus producto capitatus* fielen durch die höchsten Gesamtcarotinoidgehalte in der Gattung *Scenedesmus* auf (4,47 mg/ g TS bzw. 5,37 mg/ g TS), wohingegen diese Gattung insgesamt geringere Carotinoidgehalte enthielt als alle anderen untersuchten Grünalgen. Das Spektrum der SC ist bis auf wenige Ausnahmen identisch, Hauptunterschiede fanden sich im Gesamtcarotinoidgehalt und dem Verhältnis der einzelnen Carotinoide. Obwohl die Fähigkeit zur Ax-BS in Grünalgen weit verbreitet ist, stellen Gehalte von über 10 mg/ g TS die Ausnahme dar. Mit *Tetradesmus wisconsinensis* konnte eine Spezies

identifiziert werden, die in der Literatur bislang nicht beschrieben ist, und die als einzige Mikroalge mit 17,8 mg/ g TS vergleichbare Carotinoidgehalte produzierte wie die Referenzstämme *H. pluvialis* und *M. zoofingiensis*. Da sie sehr hohe Gehalte an Cx enthielt (49% der Carotinoide), wäre sie für die biotechnologische Gewinnung dieses Carotinoids geeignet, für das gegenwärtig kein derartiges Produktionsverfahren existiert.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der untersuchten Grünalgen war der Veresterungsgrad der hydroxylierten Carotinoide. Dieser variierte stark zwischen den analysierten Spezies und es konnte mit mäßiger Evidenz festgestellt werden, dass der erzielte Carotinoidgehalt mit dem Veresterungsgrad korreliert. In *H. pluvialis* der Mikroalge mit den höchsten bekannten SC-Gehalten, liegen die Carotinoide zu über 96% verestert vor. Der Grad der Veresterung hängt jedoch ebenfalls von der Art der akkumulierten Carotinoide ab, da z.B. Cx keine Hydroxylgruppen aufweist. Im Vergleich zu *H. pluvialis* lässt sich feststellen, dass in der Gattung *Scenedesmus* der Anteil der unveresterten Carotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt generell signifikant höher ist, im Fall von *S. rubescens* wurden bis zu 79,4% der SC unverestert produziert. Da in *H. pluvialis* ein Zusammenhang zwischen der Fettsäure-Synthese und der Ax-Biosynthese besteht, sollten die Fettgehalte sowie deren Zusammensetzung während der Stressexposition in *Scenedesmus* spp. untersucht werden, um Gründe für die Unterschiede in den SC-Gehalten aufklären zu können.

Die Analytik der Carotinoide stellte einen Schwerpunkt der Arbeiten dar. Für die HPLC-Trennung der geometrischen Ax-Isomere wurde erfolgreich eine RP30-Phase eingesetzt. Als Hauptbestandteile der Z-Isomere konnten in einem thermisch isomerisierten Ax-Standard vorläufig das 9-Z-, das 13-Z- und das 15-Z-Ax identifiziert werden. Eine eindeutige Strukturaufklärung wäre durch NMR-Spektroskopie zu erreichen. In den analysierten Mikroalgen konnte nach Stressexposition ausschließlich all-E-Ax nachgewiesen werden.

Die optischen Ax-Isomere wurden durch eine neu entwickelte chirale HPLC-Methode getrennt. Der Einsatz einer Cellulose-tris-3,5-Dimethylphenylcarbammat-Phase (Chiralcel OD-RH) zeigte hierbei eine ausreichende Enantioselektivität. Es konnte im Einklang mit der Literatur, in der Ax-Enantiomere bislang nach Derivatisierung in Diastereomere überführt und an achiralen Phasen getrennt wurden, festgestellt werden, dass Ax in Mikroalgen der Gattung *Scenedesmus* sp. hauptsächlich in der natürlichen vorkommenden 3*S*,3'*S*-Form gebildet wird, während die Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* Ax vorwiegend in der 3*R*,3'*R*-Form enthält. Die chirale HPLC-Methode ermöglicht einen schnellen Nachweis der Ax-Konfiguration, welches z.B. in Zuchtlachs enthalten ist, und kann auf diese Weise als Nachweismethode der Quelle des Futtermittelzusatzes verwendet werden (Unterscheidung zwischen chemisch oder

natürlich). Darüber hinaus stellt die Gattung somit eine alternative Ax-Quelle zum chemosynthetischen Produkt dar.

Da viele Carotinoide in der tierischen und menschlichen Nahrung vorkommen, ist die genaue Kenntnis ihrer Zusammensetzung von großem Interesse. Die vorliegende Dissertation zeigt, dass die LC-MS-Kopplung eine geeignete Methode ist, um eine Strukturaufklärung der komplexen Mischung von Carotinoiden und Carotinoidestern aus Algen durchzuführen. Für alle vorkommenden Carotinoide wurden spezifische Massenspektren aufgenommen, welche die Unterscheidung zwischen Hydroxy- und Ketocarotinoiden, sowie zwischen den Stereoisomeren Lutein und Zeaxanthin erlaubten. Die strukturell ähnlichen Fettsäureester konnten durch die Differenz zwischen der Masse ihres quasimolekularen Ions und der des entsprechenden Carotinoids ermittelt werden. In *H. pluvialis* wurden neben einer großen Anzahl von Ax-Mono- und Diestern und den Hauptkomponenten Ax-Oleat und Ax-Linoleat auch fünf Adonirubin- und ein Luteinmonoester identifiziert. Dies zeigt, dass diese Mikroalge neben Ax ebenfalls eine Mischung verschiedener SC synthetisiert, die im Anschluss verestert und nicht in Ax umgewandelt werden. Die Identifizierung der Carotinoide in *S. rubescens* ergab neben den Hauptbestandteilen der Esterfraktion Ax-Oleat und Ax-Stearat zusätzlich Adonixanthin- und Luteinester.

Die Untersuchung der Veränderung der Carotinoidezusammensetzung während der Stressexposition sollte Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt die sekundären Carotinoide und ihre Ester auftreten und welche primären Carotinoide abgebaut werden bzw. welche als Vorstufen der sekundären Carotinoide erhalten bleiben.

In *H. pluvialis* konnte eine medienabhängige Biomasse- und Carotinoideausbeute gezeigt werden. Die SC wurden simultan mit den Estern am zweiten bzw. dritten Tag gemessen, während die Gehalte der Chlorophylle und der primären Carotinoide Violaxanthin und Neoxanthin sowie β -Carotin und Lutein direkt nach Einsetzen der Stressbedingungen abnahmen. Ein quantitativ signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Medien wurde nur in den ersten neun Tagen der Kultivierung festgestellt. Nach Abschluss der Kultivierung nach 46 Tagen stieg die Carotinoidekonzentration immer noch an, es wurden unterschiedliche Verhältnisse zwischen den Mono- und Diesterfraktionen detektiert, während die qualitative Zusammensetzung identisch war. Obwohl die Lichtintensität als wichtigster Einflussfaktor auf die SC-Ausbeute beschrieben wurde (Cifuentes et al., 2003), zeigten verschiedene Medien ebenfalls einen starken Einfluss auf den erreichten Gesamtcarotinoidgehalt. Die Korrelation von Wachstum und Carotinoideausbeute ergab darüber hinaus, dass diese beiden Prozesse umgekehrt proportional waren.

In *S. rubescens* konnten die SC erst am vierten Kultivierungstag detektiert werden, der zeitabhängige Verlauf der Pigmentzusammensetzung erfolgt wie in *H. pluvialis* über den Abbau der Chlorophylle und primären Carotinoide und einer anschließenden (zeitlich versetzten) Neusynthese der SC, wobei ein verhältnismäßig hoher Luteingehalt während der gesamten Zeit der Stressexposition gemessen wurde. Nach 24 Tagen konnte bereits ein Rückgang der Carotinidgehalte und der Biomassekonzentration detektiert werden. Die Veresterung der gebildeten SC sowohl in *H. pluvialis* als auch in *S. rubescens* erfolgt simultan zur SC-Bildung, nicht zeitlich voneinander getrennt.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen während der Stressexposition zeigten zwischen dem Referenzorganismus *H. pluvialis* und der für weitere Untersuchungen selektierten Mikroalge *S. rubescens* deutliche Parallelen. Der Durchmesser der Zellen stieg an und die neu synthetisierten SC akkumulierten in cytosolischen Lipidvesikeln.

Für die Untersuchung der Ax-BS auf molekularbiologischer Ebene wurde das Schlüsselenzym des Biosyntheseweges, die BKT, ausgewählt. Es konnte erstmals ein Fragment eines *BKT*-Gens aus *S. producto capitatus* kloniert und durch eine 5'-RACE-PCR mit hoher Wahrscheinlichkeit bis in die 5'-untranslatierte Region verlängert werden. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz zeigte neben den Sequenzen, die für die Ableitung degenerierter Primer verwendet wurden, weitere orthologe Bereiche zur Aminosäure-Sequenz aus *H. pluvialis*, *M. zoofingiensis* und *Chlamydomonas nivalis*. Aus *S. rubescens* hingegen konnte keine *BKT*-Fragmente amplifiziert werden. Die erhaltene Sequenz aus *S. producto capitatus* sollte durch 3'-RACE-PCR-Ansätze komplettiert und die Promotorregion auf ihre regulatorische Funktion hin untersucht werden. Anschließend wäre der Nachweis der *BKT*-Funktionalität durch eine funktionelle Komplementierung in transgenen *E. coli* Stämmen zu führen. Über Northern-Analysen wurde die Expression des *BKT*-Gens überprüft, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben einen ersten Anhaltspunkt auf eine sehr frühe Expression sowie den Hinweis auf eine transkriptionelle Regulierung. Besonders interessant ist die Frage, wie viele *BKT*- bzw. *CRTZ*-Gene im Genom von *S. producto capitatus* enthalten sind, da die Anzahl der Genkopien ein Schlüssel für die Zusammensetzung der synthetisierten Carotinoide sein kann (Ye et al., 2007). Mit der Entwicklung eines stabilen Transformationssystems für *Scenedesmus* würde das „Metabolic Engineering“ der Ax-Biosynthese ermöglicht mit dem Ziel, die Ausbeute der natürlich gebildeten Carotinoide zu steigern bzw. das Spektrum der synthetisierten Carotinoide gezielt zu beeinflussen.

Die Ax-Synthese erfolgt in den untersuchten Grünalgen simultan über zwei Wege: über β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Adonixanthin sowie über Echinenon, Cx und Adonirubin. Es wird hierbei nicht nur das Endprodukt der SC-BS, das Ax verestert, sondern auch Intermediate wie Lutein, Adonixanthin und Adonirubin. Die Substratspezifität der SC-bildenden Enzyme BKT und CRTZ scheint gering zu sein. Für die *Scenedesmus*-Spezies konnte gezeigt werden, dass Lutein in ähnlich hohen Gehalten wie β -Carotin in den stressexponierten Stämmen vorkommt und nach einer Isomerisierung als Vorstufe für die Ax-Biosynthese in Frage kommt. Die Identifizierung von Luteinestern in *S. rubescens* und *H. pluvialis* unterstützt diese Theorie, dass diese im Cytosol während der Stressexposition gebildet werden. Die hohen Gehalte der Intermediate der Ax-BS Adonixanthin und Cx sprechen für eine artabhängig gering ausgeprägte Affinität der CRTZ bzw. der BKT in Bezug auf die jeweiligen Produkte des anderen Enzyms. Diese Beobachtungen sollten durch die Anwendung von *in vitro* Enzymassays untersucht werden.

Im Rahmen der Arbeit sollte auch die Frage geklärt werden, ob sich die Ax-Gehalte in *S. rubescens* durch eine gezielte Beeinflussung steigern lassen. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Ax- als auch die SC-Biosynthese durch die Erhöhung der Lichtintensität von 110 auf 350 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und den Einsatz von blauem bzw. UV-Licht positiv beeinflussen lassen. Neben hohen Lichtintensitäten konnte die SC-BS auch unter Verwendung sehr niedriger Lichtintensitäten und dem Einsatz von NaCl induziert werden. In *S. rubescens* hatte der Nitratmangel einen größeren Einfluss auf die Ausbeute an SC als Phosphatmangel, die Kombination beider Stressfaktoren steigerte die Ausbeute weiter (synergistischer Effekt). Der Einsatz von NaCl (69 mM und 569 mM NaCl) führte zu einer signifikanten Steigerung der Ax- und SC-Gehalte, das Meersalz-Mangelmediums zeigte mit einer Zunahme des Ausgangswertes (4,47 mg/ g TS) um das 2,9-Fache die stärkste Steigerung (12,96 mg/ g TS). Zusätzlich wurde der Einfluss von möglichen Carotinoid-Biosynthesestufen wie GAP, Pyruvat und Acetat auf die Ax-Akkumulation in *S. rubescens* und *S. producto capitatus* untersucht. In beiden Mikroalgen konnte übereinstimmend eine Konzentration von 45 mM Acetat als optimal für eine gesteigerte Carotinoideausbeute ermittelt werden, wohingegen höhere Acetatkonzentrationen eine Hemmung der SC-BS bewirkten. Für Pyruvat konnte ebenfalls höhere Ax-Ausbeuten gemessen werden. GAP wiederum erhöhte die Gehalte an SC nur in *S. rubescens*, was auf artspezifische Unterschiede hindeutet. Die Ax-Biosynthese konnte jedoch durch keine der Steigerungsversuche selektiv stimuliert werden, die Zunahme war immer mit einem Anstieg der SC-Gehalte verknüpft.

Der Gesamtcarotinoidgehalt in der Grünalge *S. rubescens* lag mit maximal 12,96 mg/ g TS noch unter dem von *H. pluvialis*, der in der vorliegenden Arbeit höchstens 20,2 mg/ g TS erzielte, aber durch die 3,4fach höhere Biomasse-Produktivität und die geringere Kontaminationsanfälligkeit stellt *S. rubescens* dennoch eine potenzielle Alternative für die Carotinoidproduktion dar.

Da die Steigerungsraten der Carotinoidausbeuten durch Variation von Kultivierungsparametern und Medienbestandteilen sowohl in der Literatur, als auch in dieser Arbeit keine produktionsrelevanten Verbesserungen erzielt haben, sollte für eine weitere Steigerung der Ax-Ausbeuten das Metabolic Engineering der Ax-produzierenden *Scenedesmus*-Stämme vorangetrieben werden. Wenn hierbei sowohl die Expression der CRTZ, der BKT als auch die der Fettsäure-Synthase gesteigert werden kann, ist die eine deutliche Steigerung der Ax-Biosyntheserate zu erwarten.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, K., Hattori, H., Hirano, M. (2005) Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chem*, 100(2), 656-661
- Abe, K., Takizawa, H., Kimura, S., Hirano, M. (2004) Characteristics of chlorophyll formation of the aerial microalga *Coelastrrella striolata* var. *multistriata* and its application for environmental biomonitoring. *J Biosci Bioeng*, 98(1), 34-39
- Abu-Lafi, S., Turujman, S. A. (1999) Reproducibility of the separation of astaxanthin stereoisomers on Pirkle covalent L-leucine and D-phenylglycine columns. *J Chromatogr A*, 855(1), 157-170
- Albrecht, M., Steiger, S., Sandmann, G. (2001) Expression of a ketolase gene mediates the synthesis of canthaxanthin in *Synechococcus* leading to tolerance against photoinhibition, pigment degradation and UV-B Sensitivity of Photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 73(5), 551-555
- Alonso, D. L., Belarbi, E. H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J., Grima, E. M. (2000) Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochem*, 54(5), 461-471
- An, G., Johnson, E. (1989) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 191-203
- Andersen, R. A. (2005) *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Arad, S., Cohen, E., Amotz, A. B. (1993) Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiol Plant* 87(2), 232-236
- Asada, K. (2003) Three billion years of oxygen and plants (1). Active oxygen biology of plants. *Kagaku to Seibutsu*, 41(4), 254-262
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Arad, S. (1995) Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J Plant Physiol*, 146, 527-534
- Barros, M. P., Pinto, E., Colepicolo, P., Pedersen, M. (2001) Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe(2+)-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1), 225-232
- BBC Inc. (2004) The Global Market for Carotenoids.
- Beihui, L., Kun, L. Y. (2001) *In vitro* biosynthesis of xanthophylls by cell extracts of a green alga *Chlorococcum*. *Plant Physiol Biochem*, 39(2), 147-154
- Bejarano, E. R., Avalos, J., Lipson, E. D., Cerdá-Olmedo, E. (1991) Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta*, 183(1), 1-9
- Ben-Amotz, A. (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for beta-carotene production. *J Appl Phycol*, 7, 65-68
- Ben-Amotz, A. (2004) In *Handbook of Microalgal Culture* (Ed, Richmond, A.) Blackwell Science, Oxford, pp. 273-280.
- Ben-Amotz, A., Grunwald, T. (1981) Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. *Plant Physiol*, 67, 613-616
- Bernhard, K. (1990) In *Carotenoids: Chemistry and Biology* (Eds, Krinsky, N. I., Mathews-Roth, M. M. und Taylor, R. F.) Plenum, New York, pp. 337-363.
- Berzelius, J. J. (1837) Über die gelbe Farbe der Blätter im Herbste. *Ann Pharm*, 21, 257-262
- Beyer, P., Weiss, G., Kleinig, H. (1985) Solubilization and reconstitution of the membrane-bound carotenogenic enzymes from daffodil chromoplasts. *Eur J Biochem*, 153(2), 341-346
- Bhosale, P. (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(4), 351-361
- Bhosale, P., Bernstein, P. S. (2005) Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(4), 445-455
- Bhosale, P., Serban, B., Bernstein, P. S. (2006) Production of deuterated lutein by *Chlorella protothecoides* and its detection by mass spectrometric methods. *Biotechnol Lett*, 28(17), 1371-1375
- Bidigare, R., Ondrusek, M., Kennicutt II, M., Iturriaga, R., Harvey, H., Hoham, R., Macko, S. (1993) Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J Phycol*, 29, 427-434

- Bjerkeng, B., Folling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J., Alsted, J. (1997) Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult*, 157, 63-82
- Böhm, V. (2000) Die HPLC-Analyse von Carotinoiden und ihre Tücken - Beobachtungen am Beispiel des Lycopins. *Lebensmittelchem*, 54, 143-144
- Bohne, F., Linden, H. (2002) Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1579(1), 26-34
- Borowitzka, L., Borowitzka, M. (1989) In *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors* (Ed, Vandamme, E.) Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Borowitzka, L. J., Borowitzka, M. A., Moulton, T. P. (1984) The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. *Hydrobiol*, 116(1), 115-121
- Borowitzka, M., Huisman, J., Osborn, A. (1991) Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I: Effects of nutrients on growth and cell type. *J Appl Phycol*, 3(4), 295-304
- Borowitzka, M. A. (2005) In *Single cell oils* (Ed, Cohen, Z., Ratledge, C.) Amer Oil Chemists Society, Champaign.
- Borowitzka, M. A., Siva, C. J. (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol*, 19(5), 567-590
- Boussiba, S. (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol Plant*, 108, 111-117
- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J. P., Zarka, A., Chen, F. (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett*, 21(7), 601-604
- Boussiba, S., Fan, L. U., Vonshak, A. (1992) Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol*, 213, 386-391
- Boussiba, S., Vonshak, A. (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol*, 32(7), 1077-1082
- Bowen, J., Soutar, C., Serwata, R., S., L., White, D., Davies, S., Young, A. (2002) Utilization of (3S,3S)-astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Nutr*, 8(1), 59-68
- Bramley, P. M., Sandmann, G. (1987) Solubilization of carotenogenic enzymes of *Aphanocapsa*. *Phytochem*, 26(7), 1935-1939
- Breithaupt, D. E. (2004) Identification and quantification of astaxanthin esters in shrimp (*Pandalus borealis*) and in a microalga (*Haematococcus pluvialis*) by liquid chromatography-mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. *J Agric Food Chem*, 52(12), 3870-3875
- Breithaupt, D. E., Wirt, U., Bamedi, A. (2002) Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 50(1), 66-70
- Brinda, B. R., Sarada, R., Kamath, B. S., Ravishankar, G. A. (2004) Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*-cultural and regulatory aspects. *Curr Sci*, 87(9), 1290-1295
- Britton, G. (1988) *Plant Pigments*, Goodwin, TW., London.
- Britton, G. (1991) The biosynthesis of carotenoids—a progress report. *Pure & Appl Chem*, 63, 101–108
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995a) In *Carotenoids Isolation and Analysis*, Vol. 1A (Eds, Britton, G., Liaaen-Jensen, S. und Pfander, H.) Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995b) *Carotenoids. Biosynthesis and Metabolism*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Brown, J. (1989) A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Res*, 14, 9549-9559
- Burczyk, J. (1987) Cell wall carotenoids in green algae which form sporopollenins. *Phytochem*, 1, 121-128
- Burczyk, J., Szkawran, H., Zontek, I., Czygan, F.-C. (1981) Carotenoids in the outer cell-wall layer of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Planta*, 151, 247-250

- Burczyk, J., Wardas, W., Terminska- Pabis, K., Smietana, B., Lebek, J. (1994) The Influence of Low Molecular Hydrocarbons on Cell Wall Carotenoids of the Alga *Scenedesmus obliquus*. *Polish J Environm Stud*, 3, 19-22
- Calo, P., de Miguel, C. S., Sieiro, C., Velazquez, J. B., Villa, T. G. (1995) Ketocarotenoids in halobacteria : 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. *J Appl Bacteriol*, 79(3), 282-285
- Camara, B. (1993) Plant phytoene synthase complex: component enzymes, immunology, and biogenesis. *Methods Enzymol*, 214, 352-365
- Careri, M., Lombardi, P., Mucchino, C., Cantoni, E. (1999) Use of eluent modifiers for liquid chromatography particle-beam electroncapture negative-ion mass spectrometry of carotenoids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13, 118-124
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Sci*, 284(5415), 760
- Chen, G., Chen, F. (2006) Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol Lett*, 28(9), 607-616
- Chitchumroonchokchai, C., Bomser, J. A., Glamm, J. E., Failla, M. L. (2004) Xanthophylls and alpha-tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells. *J Nutr*, 134(12), 3225-3232
- Choi, Y. E., Yun, Y. S., Park, J. M. (2002) Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnol Prog*, 18(6), 1170-1175
- Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M., Gonzalez, N. (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res*, 36(3-4), 343-357
- Clarke, P., Barnes, K., Startin, J., Ibe, F., Shepherd, M. (1996) High performance liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for the determination of carotenoids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10(14), 1781 - 1785
- Coral-Hinostroza, G. N., Bjerkgeng, B. (2002) Astaxanthin from the red crab langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 133(3), 437-444
- Coral-Hinostroza, G. N., Ytrestoyl, T., Ruyter, B., Bjerkgeng, B. (2004) Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 139(1-3), 99-110
- Cunningham, F. X., Gantt, E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 557-583
- Cunningham, F. X., Jr., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E., Hirschberg, J. (1993) Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene. *FEBS Lett*, 328(1-2), 130-138
- Cysewski, G. R., Lorenz, T. (2004) In *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology* (Ed, Richmond, A.) Blackwell Science, Oxford, pp. 281-288.
- Czygan, F. (1964) Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol auf den Auf- und Abbau der Pigmente einiger Grünalgen. *Arch Mikrobiol*, 47, 251-259
- Czygan, F. (1968a) Sekundär-Carotinoide in Grünalgen I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. *Arch Mikrobiol*, 61, 81-102
- Czygan, F. (1968b) Sekundär-Carotinoide in Grünalgen II. Untersuchungen zur Biogenese. *Arch Mikrobiol*, 62, 209-236
- Dachtler, M. (2000) Direktkopplung moderner Extraktions- und Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung biomedizinisch wirksamer Inhaltsstoffe. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M., Bassi, R. (2006) Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHClI antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *Plant Biol*, 6(1), 32
- Dash, R., Mohapatra, P., Mohanty, R. (1995) Salt induced changes in the growth of *Chlorococcum humicola* and *Scenedesmus bijugatus* under nutrient limited cultures. *Bull Environ Contam Toxicol*, 54, 695-702

- Day, J. D., Benson, E. E., Fleck, R. A. (1999) In vitro culture and conversation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 35, 127-136
- de Moraes, M. G., Costa, J. A. V. (2007) Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol*, 129(3), 439-445
- Del Campo, J. A., Garcia-Gonzalez, M., Guerrero, M. G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(6), 1163-1174
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol*, 76(1), 51-59
- Del Campo, J. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. Á., Rivas, J., Guerrero, M. G. (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 848-854
- Demming-Adams, B., Gilmore, A. M., Adams, W. W. (1996) *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J*, 10, 403-412
- Dersch, G. (1960) Mineralsalz-mangel und Sekundär-carotinoide in Grünalgen. Dissertation, Botanisches Institut, Philipps-Universität, Marburg
- Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H., Rohmer, M. (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J*, 333, 381-388
- Domínguez-Bocanegra, A., Torres-Muñoz, J. (2004) Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66, 249-252
- Dominguez-Bocanegra, A. R., Guerrero Legarreta, I., Martinez Jeronimo, F., Tomasini Campocoso, A. (2004) Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*, 92(2), 209-214
- Dong, Q., Zhao, X., Xing, X., Hu, J., Gong, J. (2007) NH secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions. *Chin J Chem Eng*, 15(2), 162-166
- Donkin, P. (1976) Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus lacustris*. *Phytochem*, 15, 711-715
- Droop, M. R. (1954) Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Arch Mikrobiol*, 20, 391-397
- El-Jack, M., Mackenzie, A., Bramley, P. M. (1988) The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* mutant. *Planta*, 174, 59-66
- El Baz, F. K., Aboul-Enein, A. M., El-Baroty, G. S., Youssef, A. M., Abdel-Baky, H. H. (2002) Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *OnLine J Biol Sci*, 2(4), 220-223
- Eonseon, J., Lee, C., Polle, J. (2006) Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *J Microbiol Biotechnol*, 16(6), 821-831
- Eonseon, J., Polle, J., Lee, H., Hyun, S., Chang, M. (2003) Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *J Microbiol Biotechnol*, 13(2), 165-174
- Erdmann, N., Hagemann, M. (2001) In *Algal adaptation to environmental stresses* (Eds, Rai, L. C. und Gaur, J. P.) Springer, Berlin.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Maseda, A., Otero, A. (2003) Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(5-6), 545-551
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A. (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53(5), 530-535
- Falkowski, P. G., Raven, J. A. (1997) *Aquatic Photosynthesis*, Blackwell Science Malden, Boston.
- Fan, L., Vonshak, A., Boussiba, S. (1994) Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Phycol*, 30, 829-833

- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirschberg, J., Cohen, Z., Bousiba, S. (1995) The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicator by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiol* 36(8), 1519-1524
- Fan, L., Vonshak, A., Zarka, A., Boussiba, S. (1998) Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage? *Z Naturforsch [C]*, 53(1-2), 93-100
- Fedina, I., Benderliev, K. (2000) Response of *Scenedesmus incrassatulus* to salt stress as affected by methyl jasmonate *Biol Plant*, 43(4), 625-627
- Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2000) Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chrom A*, 871(1-2), 43-56
- Fogg, G. E. (1969) Survival of algae under adverse conditions. *Symp Soc Exp Biol* 23, 123-142
- Fraser, P., Shimada, H., Misawa, N. (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay. *Eur J Biochem*, 252, 229-236
- Fraser, P. D., Bramley, P. M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 43(3), 228-265
- Fraser, P. D., Miura, Y., Misawa, N. (1997) *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem*, 272(10), 6128-6135
- García-Malea, M. C., Brindley, C., Del Rio, E., Aceen, E. G., Fernandez, J. M., Molina, E. (2005) Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochem Eng J*, 26, 107-114
- Garrido, J. L., Zapata, M. (1993) High performance liquid chromatographic separation of polar and non-polar chlorophyll pigments from algae using a wide pore polymeric octadecylsilica column. *Journal of High Resolution Chromatography*, 16(4), 229 - 233
- Gerber, S., Häder, D. P. (1994) Effects of enhanced UV-B irradiation on the red coloured freshwater flagellate *Euglena sanguinea*. *FEMS Microbiol Ecol*, 13(3), 177-184
- Glaser, T. (2001) Bioverfügbarkeit von Carotinoiden und deren Metabolisierung in Serum und Retina: Anwendung von HPLC-NMR- und HPLC-APCI-MS-Kopplung. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Goes, J. I., Handa, N., Taguchi, S., Hama, T. (1994) Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis* sp.: relationship to cellular pigments. *Mar Ecol Prog Ser*, 114, 259-274
- Goodwin, T. W. (1954) Some observations on carotenoid synthesis by the alga *Chlorella vulgaris*. *Experientia*, 10(5), 213-214
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J. (1996) Evolution of Pigment Composition in *Chlorella vulgaris*. *Biores Technol*, 57, 157-163
- Graham, L. E., Wilcox, L. W. (2000) *Algae*, Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Grewe, C., Loest, K., Pulz, O., Griehl, C. (2003) Mass spectrometric investigation of secondary carotenoids from biological sources. 5th European Workshop on Biotechnology of Microalgae Potsdam Rehbrücke, S. 85
- Grewe, C., Menge, S., Griehl, C. (2007) Enantioselective separation of all-E-astaxanthin and its determination in microbial sources. *J Chrom A*, 1166(1-2), 97-100
- Gross, G. J., Hazen, S. L., Lockwood, S. F. (2006) Seven day oral supplementation with Cardax (disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats. *Mol Cell Biochem*, 283(1-2), 23-30
- Gross, G. J., Lockwood, S. F. (2005) Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) produces marked cardioprotection in dog hearts. *Mol Cell Biochem*, 272(1-2), 221-227
- Grünewald, K., Eckert, M., Hirschberg, J., Hagen, C. (2000) Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). *Plant Physiol*, 122(4), 1261-1268
- Grünewald, K., Hagen, C. (2001) beta-carotene is the intermediate exported from the chloroplast during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol*, 13, 89-93

- Grünewald, K., Hirschberg, J., Hagen, C. (2001) Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biol Chem*, 276(8), 6023-6029
- Grung, M., D'Souza, F., Borowitzka, M., Liaaen-Jensen, S. (1992) Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J Appl Phycol*, (4), 165-171
- Grung, M., Metzger, P., Berkaloff, C., Liaaen-Jensen, S. (1994) Studies on the formation and localization of primary and secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, including the regreening process. *Comp Biochem Physiol*, 107B, 265-272
- Hagen, C., Braune, W., Björn, L. (1994) Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a "sunshade" *J Phycol*, 30(2), 241-248
- Hagen, C., Braune, W., Greulich, F. (1993) Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). IV: Protection from photodynamic damage. *J Photochem Photobiol B*, 20(2-3), 153-160
- Hagen, C., Grünewald, K. (2000) Fosmidomycin as an Inhibitor of the non-mevalonate terpenoid pathway depresses synthesis of secondary carotenoids in flagellates of the green alga *H. pluvialis*. *J Appl Bot*, 74, 137-140
- Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S., Müller, J. (2000) Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *Eur J Phycol*, 35(1), 75-82
- Hager, A., Stransky, H. (1970) Das Carotenoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen III. Grünalgen. *Arch Microbiol*, 72, 68-83
- Hanagata, N., Dubinsky, Z. (1999) Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J Phycol*, 35, 960-966
- Harker, M., Tsavalos, A., Young, A. (1995) Use for response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol*, 7(4), 399-406
- Harker, M., Tsavalos, A. J., Young, A. J. (1996) Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Biores Technol*, 55, 207-214
- Hata, N., Ogonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. (2001) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J Appl Phycol*, 13(5), 395-402
- Haugan, J., Aackermann, T. (1995) In *Carotenoids: Isolation and Analysis*, Vol. 1A (Eds, Britton, G., Liaaen-Jensen, S. und Pfander, H.) Birkhäuser, Basel.
- He, P., Duncan, J., Barber, J. (2007) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. *J Integr Plant Biol*, 49(4), 447-451
- He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O., Grossman, A. R. (2001) The High Light-inducible Polypeptides in *Synechocystis* PCC6803 expression and function in high light. *J Biol Chem*, 276(1), 306-314
- Heinz, E. (1993) In *Lipid Metabolism in Plants* (Eds, Vick, B. A. und Moore, T. S.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 33-89.
- Hejazi, M. A., Holwerda, E., Wijffels, R. H. (2004) Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 85(5), 475-481
- Hessen, D. O., Van Donk, E., Andersen, T. (2001) Growth responses, P-uptake and loss of flagellae in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *Environ Sci Technol*, 17(1), 17-27
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. (2006) Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(2), 185-196
- Hix, L. M., Lockwood, S. F., Bertram, J. S. (2004) Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression. *Redox Rep*, 9(4), 181-191
- Hoeffler, J. F., Hemmerlin, A., Grosdemange-Billiard, C., Bach, T. J., Rohmer, M. (2002) Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem J*, 366(2), 573-583
- Hu, Q. (2003) In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Ed, Richmond, A.) Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Huang, J. C., Chen, F., Sandmann, G. (2006a) Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol*, 122(2), 176-185

- Huang, J. C., Wang, Y., Sandmann, G., Chen, F. (2006b) Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene from *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(4), 473-479
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod*, 69(3), 443-449
- Ip, P., Chen, F. (2005a) Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochem*, 40, 2491-2496
- Ip, P., Chen, F. (2005b) Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem*, 40, 733-738
- Ip, P., Wong, K., Chen, F. (2004) Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Proc Biochem*, 39, 1761-1766
- Isaacson, T., Ohad, I., Beyer, P., Hirschberg, J. (2004) Analysis *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol*, 136(4), 4246-4255
- Jeffrey, S., Humphrey, G. (1975) New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2. *Biochem Physiol Pflanz*, 167, 194-204
- Jin, E., Lee, C., Polle, J. (2006) Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *J Microbiol Biotechnol*, 16(6), 821-831
- Johnson, E., An, G. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol*, 4(11), 297-326
- Johnson, E. A. (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol*, 6(3), 169-174
- Joo, H. N., Lee, C. G. (2007) Antibiotics addition as an alternative sterilization method for axenic cultures in *Haematococcus pluvialis*. *J Ind Eng Chem*, 13(1), 110-115
- Junling, L., Jinlai, M., Xiuqin, S., Quanfu, W., Guangyou, L. (2007) Isolation and optimization of production of astaxanthin from antarctic yeast *Rhodotorula* sp. NJ298. *High Technol Lett*, 13(1), 103-108
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., Gross, M. D. (2000) Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr Cancer*, 36(1), 59-65
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S., Misawa, N. (1995) Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol*, 29(2), 343-352
- Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H., Sim, S. J. (2005) Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(2), 237-241
- 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(5), 987-994
- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., Katoh, S. (2004) Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microbial Technol*, 35(1), 81-86
- Kessler, E. (1977) Physiological and Biochemical Contributions to the Taxonomy of the Genera *Ankistrodesmus* and *Scenedesmus* IV. Salt Tolerance and Thermophily. *Arch Microbiol*, 113, 143-144
- Kessler, E. (1982) Chemotaxonomy in the Chlorococcales. *Progr Phycol Res*, 1, 111-135
- Kessler, E., Czygan, F. (1967) Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*. *Arch Mikrobiol*, 55, 320-326
- Kessler, E., Schäfer, M., Hümmer, C., Kloboucek, A., Huss, V. (1997) Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Bot Acta*, 110, 244-250
- Kobayashi, M. (1993) Studies on the astaxanthin formation in a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. Dissertation, Department of Fermentation Technology, Hiroshima University
- Kobayashi, M., Hirai, N., Kurimura, Y., Ohigashi, H., Tsuji, Y. (1997a) Abscisic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Growth Regulation*, 22, 79-85
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1991) Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J Ferment Bioeng*, 71(5), 335-339

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl Environ Microbiol*, 59(3), 867-873
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishino, H., Nagai, S. (1992) Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J Ferment Bioeng*, 74(1), 61-63
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Tsuji, Y. (1997b) Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol Lett*, 19(6), 507-509
- Kopecky, J., Schoefs, B., Loest, K., Stys, D., Pulz, O. (2000) Microalgae as a source for secondary carotenoid production: a screening study. *Algological Stud*, 198, 153-168
- Kreuz, K., Beyer, P., Kleinig, H. (1982) The site of carotenogenic enzymes in chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus* L. *Planta*, 154(1), 66-69
- Krinsky, N. I. (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl Chem*, 51(64), 660
- Krywalska, M., Skrzypczyk, J. (1977) Influence of nitrate concentration on pigment content in *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Soc Bot Pol*, XLVI,
- Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y., Tanaka, T. (2002) Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci*, 70(21), 2509-2520
- Lacker, T., Strohschein, S., Albert, K. (1999) Separation and identification of various carotenoids by C30 reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 854(1-2), 37-44
- Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, T. J., Lee, W. J., Kim, Y. T. (2004) *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(5), 1699-1702
- Lee, J. H., Kim, Y. T. (2006) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene*, 370, 86-95
- Lee, S. J., Bai, S. K., Lee, K. S., Namkoong, S., Na, H. J., Ha, K. S., Han, J. A., Yim, S. V., Chang, K., Kwon, Y. G., Lee, S. K., Kim, Y. M. (2003) Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-(kappa)B activation. *Mol Cells*, 16(1), 97-105
- Lee, Y., Ding, S. (1995) Effects of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* *J Phycol*, 31, 922-924
- Lee, Y., Zhang, D. (1999) In *Chemicals from microalgae* (Ed, Cohen, Z.) Taylor & Francis Ltd., London, pp. 173-195.
- Liaaen-Jensen, S., Egeland, E. S. (1999) *Microalgal Carotenoids*, Taylor & Francis Ltd., London.
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S., van Broock, M. (2008) Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35(3), 151-158
- Linden, H. (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim Biophys Acta*, 1446(3), 203-212
- Liu, B.-H., Lee, Y. K. (2000) Secondary carotenoid formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J Appl Phycol*, 12, 301-307
- Liu, B.-H., Zhang, D. H., Lee, Y. K. (2000) Effects of nutrient levels on cell growth and secondary carotenoid formation in the freshwater green alga, *Chlorococcum* sp. *J Microbiol Biotechnol*, 10(2), 201-207
- Liu, H. I. (1984) Effects of temperature and light intensity on growth rate, physiological and biochemical characteristics of *Spirulina platensis*. *Zhonghua Nongye Yanjiu*, 33, 276-291
- Lotan, T., Hirschberg, J. (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding beta-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett*, 364(2), 125-128
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A. B., O'Halloran, D. M., Cosman, K. M., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., Garvin, D. F., Vrebalov, J. (2006) The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant Cell*, 18(12), 3594-3605

- Lubián, L., Montero, O., G.I. M.-., Huertas, I. E., Sobrino, C., González-del Valle, M., Parés, G. (2000) *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12, 249-255
- Lura, H., Sægrov, H. (1991) A method of separating offspring from farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on different ratios of optical isomers of astaxanthin. *Can J of Fish Aquat Sci*, 48, 429-433
- Ma, R. Y.-N., Chen, F. (2001) Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Proc Biochem*, (36), 1175-1179
- Mahmoud, F. F., Haines, D. D., Abul, H. T., Abal, A. T., Onadeko, B. O., Wise, J. A. (2004) In vitro effects of astaxanthin combined with ginkgolide B on T lymphocyte activation in peripheral blood mononuclear cells from asthmatic subjects. *J Pharmacol Sci*, 94(2), 129-136
- Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A. (1983) The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 151(2), 297-314
- Masojidek, J., Torzillo, G., Koblizek, M., Kopecky, J., Bernardini, P., Sacchi, A., Komenda, J. (1999) Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta*, 209, 126-135
- Masojidek, J., Torzillo, G., Kopecky, J., Koblizek, M., Nidiaci, L., Komenda, J. (2000) Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J Appl Phycol*, 12, 417-426
- Matsuno, T., Maoka, T., Katsuyama, M., Ookubo, M., Katagiri, K., Jimura, H. (1984) The occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin in aquatic animals. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 50, 1589-1592
- Matthews, S. J., Ross, N. W., Lall, S. P., Gill, T. A. (2006) Astaxanthin binding protein in Atlantic salmon. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 144(2), 206-214
- Mayer, F., Czygan, F. (1969) Änderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca* var. *rubescens* bei Stickstoffmangel. *Planta*, (86), 175-185
- Mendoza, H., Martel, A., Jiménez del Rio, M., Reina, G. (1999) Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol*, 11, 15-19
- Meng, C. X., Liang, C. W., Su, Z. L., Qin, S., Tseng, C. K. (2006) There are two 5' -flanking regions of bkt encoding beta-carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*. *Phycologia*, 45(2), 218-224
- Mercke Odeberg, J., Lignell, A., Pettersson, A., Hoglund, P. (2003) Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur J Pharm Sci*, 19(4), 299-304
- Miao, F., Lu, D., Li, Y., Zeng, M. (2006) Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 352(2), 176-181
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(12), 6704-6712
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol*, 177(22), 6575-6584
- Moretti, V. M., Mentasti, T., Bellagamba, F., Luzzana, U., Caprino, F., Turchini, G. M., Giani, I., Valfre, F. (2006) Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish the dietary pigmentation source. *Food Addit Contam*, 23(11), 1056-1063
- Morris, W. L., Ducreux, L. J., Fraser, P. D., Millam, S., Taylor, M. A. (2006) Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metab Eng*, 8(3), 253-263
- Naguib, Y. M. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem*, 48(4), 1150-1154
- Nelis, H., De Leenheer, A. P. (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feeds. *J Appl Bacteriol*, 70, 181-191

- Nelis, H., Van Steenberge, M. M. Z., Lefevere, M. F., De Leenheer, A. P. (1986) Selectivity effects in non-aqueous reversed-phase and normal-phase chromatography of geometric canthaxanthin isomers. *J Chromatogr*, 353, 295-302
- Nelson, M. A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N., Macino, G. (1989) Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Mol Cell Biol*, 9(3), 1271-1276
- Norton, T. A., Melkonian, M., Andersen, R. A. (1996) Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308-326
- Oliver, J., Palou, A. (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J Chromatogr A*, 881, 543-555
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J. (2001a) Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnol Lett*, (23), 373-378
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J. (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*, 96(3), 373-378
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., Abalde, J. (2000) Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *J Appl Phycol*, 12, 553-556
- Orosa, M., Valero, J. F., Herrero, C., Abalde, J. (2001b) Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-tarvation and high light conditions. *Biotechnol Lett*, 23, 1079-1085
- Orset, S. C., Young, A. J. (2000) Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis β , β -carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). *Plant Physiol*, 122(2), 609
- Osterlie, M., Bjerke, B., Liaaen-Jensen, S. (1999) Accumulation of astaxanthin all-E, 9Z and 13Z geometrical isomers and 3 and 3' RS optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *J Nutr*, 129(2), 391-398
- Park, E. K., Lee, C. G. (2001) Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *J Microbiol Biotechnol*, 11(6), 1024-1030
- Pelah, D., Sintov, A., Cohen, E. (2004) The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World J Microbiol Biotechnol*, 20, 483-486
- Pringsheim, E. (1966) Nutritional requirements of *Haematococcus* and related species. *J Phycol*, 2, 1-7
- Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57(3), 287-293
- Pylotitis, N. A., Goodchild, D. J. (1975) The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella fusca* II. Structural changes during synchronous regreening. *Arch Microbiol*, 103(3), 259-270
- Qin, S., Liu, G. X., Hu, Z. Y. (2008) The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochem*, doi:10.1016/j.procbio.2008.03.010,
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J., Hugueney, P., Kleinig, H. (1998) Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*, 116(4), 1239-1248
- Raja, R., Hema Iswarya, S., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R. (2007) PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiol Res*, 162(2), 168-176
- Rao, A., Sarada, R., Ravishankar, G. (2007) Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *J Sci Food Agric*, 87(6), 957 - 965
- Rao, A. V., Rao, L. G. (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*, 55(3), 207-216
- Rau, W., Rau-Hund, A. (1977) Light-dependent carotenoid synthesis. *Planta*, 136(1), 49-52
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., Lütz, C. (2005) Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur J Phycol*, 40(3), 259-268
- Remias, D., Lütz, C. (2007) Characterization of esterified secondary carotenoids and of their isomers in green algae: a HPLC approach. *Algological Stud*, 124, 85-94
- Renstrom, B., Berger, H., Liaaen-Jensen, S. (1981) Esterified, optically pure (3S, 3'S)-astaxanthin from flowers of *Adonis annua*. *Biochem Syst Ecol*, 9, 249-250
- Renstrom, B., Liaaen-Jensen, S. (1981) Fatty acid composition of some esterified carotenols. *Comp Biochem Physiol B*, 69, 625-627

- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L., Wickline, H. E. (1969) Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 18(2), 245-250
- Richter, G. (1982) *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen*, Thieme Stuttgart, Stuttgart.
- Rise, M., Cohen, E., Vishkautsan, M., Cojocar, M., Gottlieb, H., Arad, S. (1994) Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J Plant Physiol*, 144, 287-292
- Rmiki, N., Lemoine, Y., Schoefs, B. (1999) In *Handbook of Plant and Crop Science* (Ed, Pessaraki, M.) Marcel Dekker, New York.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001) *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*, Ilsi Press, Washington D.C.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16(5), 565-574
- Rymon Lipinski, G. W. v., Lück, E. (2006) In *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker* (Ed, Frede, W.) Springer, Berlin, pp. 313-332.
- Sadka, A., Lers, A., Zamir, A., Avron, M. (1989) A critical examination of the role of *de novo* protein synthesis in the osmotic adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella*. *FEBS Lett*, 244, 93-98
- Sanchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D., Narvaez-Zapata, J. A. (2006) Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnol Lett*, 28(11), 787-791
- Sander, L. C., Sharpless, K. E., Craft, N. E., Wise, S. A. (1994) Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal Chem*, 66(10), 1667-1674
- Sandmann, G. (1997) High level expression of carotenogenic genes for enzyme purification and biochemical characterization. *Pure Appl Chem*, 66, 2163-2168
- Santos, M. F., Mesquita, J. F. (1984) Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales). I: Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*, 49(1), 215-228
- Schafer, L., Sandmann, M., Woitsch, S., Sandmann, G. (2006) Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Environ*, 29(7), 1349-1356
- Schiedt, K. (1998) In *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*, Vol. 3 (Eds, Britton, G., Liaaen-Jensen, S. und Pfander, H.) Birkhäuser, Basel.
- Schiedt, K., Leuenberger, F., Vecchi, M. (1981) Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. 5. Ex wild salmon (*Salmo salar* and *Oncorhynchus*). *Helv Chim Acta*, 64(2), 449-457
- Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S. (1995) In *Carotenoids: Isolation and analysis*, Vol. 1A (Eds, Britton, G., Liaaen-Jensen, S. und Pfander, H.) Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 81-108.
- Schmidt-Dannert, C. (2000) Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 11(3), 255-261
- Schoefs, B., Rmiki, N., Rachadi, J., Lemoine, Y. (2001) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Lett*, 500(3), 125-128
- Schofield, A., Paliyath, G. (2005) Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol Biochem*, 43(12), 1052-1060
- Schwartz, S. J., Von Elbe, J. H. (1982) High performance liquid chromatography of plant pigments— a review. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 5(1), 43-73
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J*, 316 (Pt 1), 73-80
- Setlik, I. (1968) In *Ann Rep Alg Lab Trebon 1967* (Eds, Neccaronas, J. und Lhotský, O.), pp. 71-140.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U., Ben-Amotz, A. (1993) Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*, 190(3), 363-368
- Shehawey, R. M., Kleiner, D. (2001) In *Algal adaption to environmental stresses* (Eds, Rai, L. C. und Gaur, J. P.) Springer, Berlin.
- Shifrin, N. S., Chisholm, S. W. (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol*, 17(4), 374-384

- Singh, S. C., Sinha, R. P., Hader, D. P. (2002) Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, 41(4), 297-308
- Siron, R., Giusti, G., Berland, B. (1989) Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tri-cornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar Ecol Prog Ser*, 55, 95-100
- Skoda, B. (1997) Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerinck s.l.-pigment composition. II. Biochemotaxonomical differences in pigment composition of the strains growing under nitrogen deficient nutritional conditions. *Algological Stud*, 87, 109-136
- Steiger, S., Sandmann, G. (2004) Cloning of two carotenoid ketolase genes from *Nostoc punctiforme* for the heterologous production of canthaxanthin and astaxanthin. *Biotechnol Lett*, 26(10), 813-817
- Steinbrenner, J. (2006) Regulation der Astaxanthinbiosynthese in der Grünalge *Haematococcus pluvialis*. Fachbereich Biologie, Universität Konstanz
- Steinbrenner, J., Linden, H. (2001) Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol*, 125(2), 810-817
- Steinbrenner, J., Linden, H. (2003) Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol Biol*, 52(2), 343-356
- Storebakken, T., No, H. K. (1992) Pigmentation of rainbow trout. *Aquacult*, 100(1-3), 209-229
- Takaichi, S., Matsui, K., Nakamura, M., Muramatsu, M., Hanada, S. (2003) Fatty acids of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 136(2), 317-322
- Tan, C., Zhao, F., Su, Z., Liang, C., Qin, S. (2007) Expression of β -carotene hydroxylase gene (crtR-B) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol*, 19, 347-355
- Tanaka, Y., Yamada, S., Yokoyama, H. (1996) Effect of 2-(p-methylphenoxy)-triethylamine Hydrochloride on the pigments in *Scenedesmus obliquus*. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University*, 45, 1-4
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2004) The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*, 58(2), 100-110
- Tillberg, J. E., Rowley, J. R. (1989) Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *Scenedesmus*. *Physiol Plant*, 75(3), 315-324
- Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishino, N., Nagai, S. (1994) Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol Lett*, 16(2), 133-138
- Tolbert, N. E., Zill, L. P. (1956) Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis. *J Biol Chem*, 222(2), 895-906
- Torrissen, O., Hardy, R., Shearer, K. (1989) Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit Rev Aquat Sci*, 209-225
- Tripathi, U., Sarada, R., Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G. A. (1999) Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresour Technol*, 68, 197-199
- Trösch, W. (2000) Wertstoffe aus Mikroalgen – regenerativ, umweltfreundlich und wirtschaftlich. *Biotechnol BW*, 11, 10-11
- Tsubokura, A., Yoneda, H., Mizuta, H. (1999) *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram negativ astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 277-282
- Turujman, S. A. (1993) Rapid direct resolution of the stereoisomers of all-trans astaxanthin on a Pirkle covalent L-leucine column. *J Chromatogr*, 631(1-2), 197-199
- Turujman, S. A., Wamer, W. G., Wei, R. R., Albert, R. H. (1997) Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. *J AOAC Int*, 80(3), 622-632
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., Yoshikawa, T. (2002) Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep*, 7(5), 290-293
- van Breemen, R. B. (1996) Innovations in carotenoid analysis using LC/MS. *Anal Chem*, 68, 299A-304A

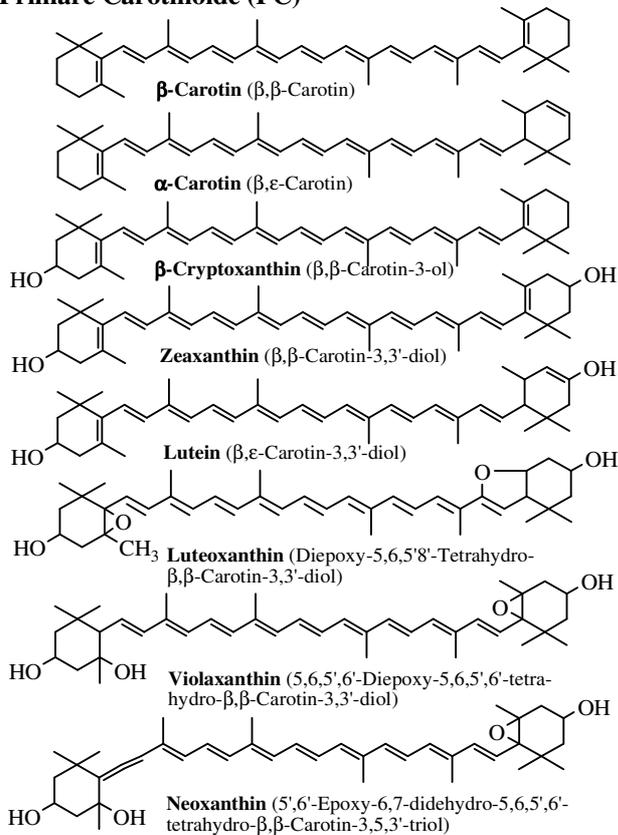
- van Breemen, R. B., Huang, C. R., Tan, Y., Sander, L. C., Schilling, A. B. (1996) Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom*, 31(9), 975-981
- Vecchi, M., Müller, R. (1979) Separation of (3S, 3' S)-, (3R, 3' R)- and (3S, 3' R)-astaxanthin via (-)-camphanic acid esters. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, 2, 195-196
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Kamath, B. S., Sarada, R., Ravishankar, G. A. (2007) Differential expression of carotenogenic genes and associated changes in pigment profile during regeneration of *Haematococcus pluvialis* cysts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(4), 879-887
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailliau, C., Marty, J. (1996) Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinylchlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J Plankt Res*, 18(12), 2377-2382
- Vine, A. L., Leung, Y. M., Bertram, J. S. (2005) Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences. *Mol Carcinog*, 43(2), 75-85
- Vonshak, A., Torzillo, G. (2003) In *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology* (Ed, Richmond, A.) Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Wackenroder, H. (1831) *Mag Pharm*, 33, 144
- Wainer, I. W. (1987) Proposal for the classification of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases: how to choose the right column. *Trends Anal Chem*, 6(5), 125-134
- Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., Boussiba, S. (2003) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J Phycol*, 39(6), 1116
- Weber, A. (1974) Chlorophylls and carotenoids of the chaetophorineae (Chlorophyceae, Ulotrichales). 2. Der Einfluss unterschiedlicher Stickstoffkonzentrationen auf die Pigmentgaritur und die Morphogenese der Grünalge *Fritschiella tuberosa* Iyengar. *Arch Microbiol*, 102, 45-52
- Webera, R., Ankeb, H., Davolic, P. (2007) Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi) *J Chromatogr A*, 1145(1-2), 118-122
- Whittaker, R. (1969) New concept of kingdoms. *Sci*, 163, 150-160
- Wilhelm, C. (1999) *Photosynthese der Algen*, Thieme, Stuttgart.
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H. (2000) Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecol*, 34, 119-126
- Wingerath, T., Stahl, W., Kirsch, D., Kaufmann, R., Sies, H. (1996) Fruit juice carotenol fatty acid esters and carotenoids as identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 44(8), 2006-2013
- Wollenweber, W. (1907) Untersuchungen über die Algengattung *Haematococcus*. *Ber Deutsch bot Ges*, 26, 238-298
- Wright, S. W., Shearer, J. D. (1984) Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J Chromatogr*, 294, 281-295
- Yan, Y., Zhu, Y. H., Jiang, J. G., Song, D. L. (2005) Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular chlorophyte, *Dunaliella salina*. *J Agric Food Chem*, 53(5), 1466-1469
- Ye, R. W., Yao, H., Stead, K., Wang, T., Tao, L., Cheng, Q., Sharpe, P. L., Suh, W., Nagel, E., Arcilla, D., Dragotta, D., Miller, E. S. (2007) Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34(4), 289-299
- Yin-Nin Ma, R., Chen, F. (2001) Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnol Lett*, 23, 519-523
- Yong, Y., Lee, Y. (1991) Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? *Phycologia*, 30(3), 257-261
- Ytrestoyl, T., Bjerkeng, B. (2007) Intraperitoneal and dietary administration of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Plasma uptake and tissue distribution of geometrical E/Z isomers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 147(2), 250-259
- Yuan, J., Chen, F. (1997) Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnol Techn*, 11(7), 455-459
- Yuan, J., Chen, F. (1998) Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem*, (46), 3371-3375

- Yuan, J., Chen, F., Lui, X., Li, X. (2002) Carotenoid composition in the green microalgae *Chlorococcum*. *Food Chem*, 76, 319-325
- Yuan, J. P., Chen, F. (1999) Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *J Agric Food Chem*, 47(1), 31-35
- Yuan, J. P., Chen, F. (2000) Purification of trans-astaxanthin from high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chem*, 68, 443-448
- Yuan, J. P., Chen, F. (2001) Kinetics for the reversible isomerization reaction of trans-astaxanthin. *Food Chem*, 73(2), 131-137
- Yuan, J. P., Gong, X. D., Chen, F. (1996) Separation and identification of astaxanthin esters and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by HPLC. *Biotechnol Techn*, 10(9), 655-660
- Zechmeister, L. (1962) *Cis trans Isomeric Carotenoids Vitamin A and Arylpolyenes*, Springer Verlag.
- Zhang, D.-H., Lee, Y.-K. (2001) Two-step process for ketocarotenoid production by green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 537-540
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., Cohen, Z. (2002) Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J Phycol*, 38(2), 325-331
- Zhekisheva, M., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2005) Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) *Journal of Phycology*, 41(4), 819
- Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 53(1), 247-273

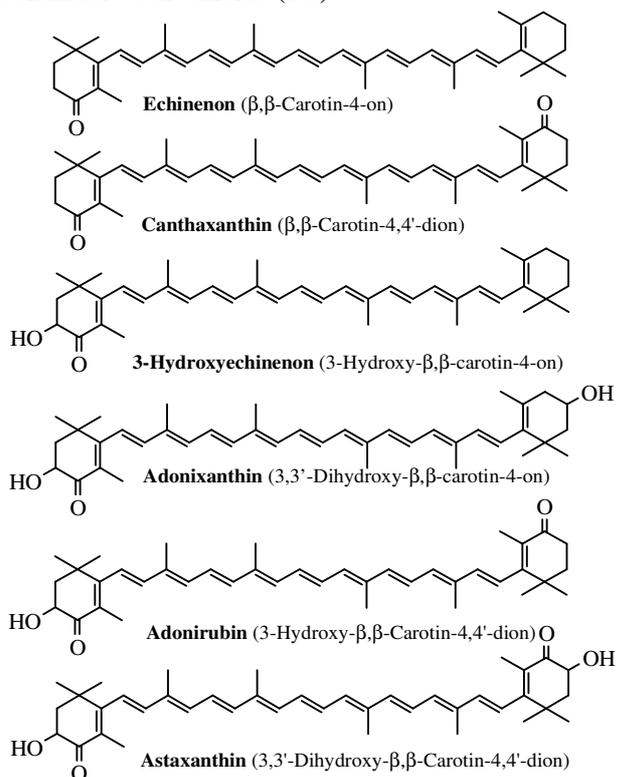
7. Anhang

Anhang A – Strukturformeln primärer und sekundärer Carotinoide

Primäre Carotinoide (PC)



Sekundäre Carotinoide (SC)



Anhang B – Zusammensetzungen autotropher Wachstums- und Stressmedien

Tabelle 25 : Zusammensetzung der autotrophen Wachstumsmedien für Mikroalgen (Angabe in mg/ L falls nicht anders angegeben)

Salze	Setlik	MiEB ₁₂	ES	BBM	OHM	PET
KNO ₃	2020	100	200	400	400	80
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-	30	14
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	-	-	-	-	-	47
K ₂ HPO ₄	-	-	20	75	-	-
KH ₂ PO ₄	340	-	-	175	-	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	10	-	-	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	-	-	-	25	110	30
Ca(NO ₃) ₂ *2H ₂ O	10	-	-	-	-	-
CaSO ₄ (ges. Lösung)	-	10 mL/L	-	-	-	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	990	10	20	75	246	10
NaCl	-	-	-	25	-	47
Fe(III)Citrat*H ₂ O	-	-	-	-	2,62	-
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	-	1	-	-	-	-
CoCl ₂ *6H ₂ O	-	-	-	0,012	0,011	-
CoSO ₄	1,24	-	-	-	-	-
CuSO ₄ *5H ₂ O	1,24	0,005	0,005	-	0,012	-
Cr ₂ O ₃	-	-	-	-	0,075	-
FeCl ₃ *6H ₂ O	-	-	-	0,58	-	-
ZnCl ₂	-	-	-	0,03	-	-
ZnSO ₄	1,43	-	-	-	-	-
MnSO ₄ *4H ₂ O	1,2	2	2	-	-	-
MnCl ₂ *4H ₂ O	-	-	-	0,25	0,98	0,5
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	-	1	1	0,04	0,12	-
SeO ₂	-	-	-	-	0,005	-
Na ₂ -EDTA	-	4	4	4,5	-	1
Fe-Na-EDTA	18,5	-	-	-	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	-	3,5	3,5	-	-	3
H ₃ BO ₃	3,09	10	10	-	-	0,5
ZnSO ₄ *7H ₂ O	-	1	1	-	-	0,2
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	1,84	-	-	-	-	0,02
Erdextrakt	-	30 mL/L	30 mL/L	-	-	-
Vitamine						
Biotin	-	-	-	2,5*10 ⁻⁴	0,025	-
Thiamin	-	-	-	1	0,00175	-
Vitamin B ₁₂	-	0,005	-	1,5*10 ⁻⁴	0,015	-
pH-Wert				6,4	7,6	6,5

Tabelle 26 : autotrophe Stressmedien für Mikroalgen

Salze	Setlik-Stress	BBM-Stress	OHM-Stress	PET-Stress
KNO ₃	-	-	-	8,1
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	-	25	110	30
Ca(NO ₃) ₂ *2H ₂ O	10	-	-	-
CaSO ₄ (ges. Lösung)	-	-	-	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	990	75	246	10
NaCl	4040	25	-	47
Fe(III)Citrat*H ₂ O	-	-	2,62	-
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	-	-	-	-
CoCl ₂ *6H ₂ O	-	0,012	0,011	-
CoSO ₄	1,24	-	-	-
CuSO ₄ *5H ₂ O	1,24	-	0,012	-
Cr ₂ O ₃	-	-	0,075	-
FeCl ₃ *6H ₂ O	-	0,58	-	-
ZnCl ₂	-	0,03	-	-
ZnSO ₄	1,43	-	-	-
MnSO ₄ *4H ₂ O	1,2	-	-	-
MnCl ₂ *4H ₂ O	-	0,25	0,98	0,5
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	-	0,04	0,12	-
SeO ₂	-	-	0,005	-
Na ₂ -EDTA	-	4,5	-	1
Fe-Na-EDTA	18,5	-	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	-	-	-	3
H ₃ BO ₃	3,09	-	-	0,5
ZnSO ₄ *7H ₂ O	-	-	-	0,2
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	1,84	-	-	0,02
Erdextrakt	-	-	-	-
Vitamine				
Biotin	-	2,5*10 ⁻⁴	0,025	-
Thiamin	-	1	0,00175	-
Vitamin B ₁₂	-	1,5*10 ⁻⁴	0,015	-
pH-Wert		6,4	7,6	6,5

Für die Herstellung des Instant Ocean-Stressmediums wurden 33 g Salzmischung in einem L aqua dest. gelöst, 1,5h gerührt und anschließend steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser).

Anhang C – Rohdaten der im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen (Auszug)

Tabelle 27: Carotinoidzusammensetzungen und –gehalte (mg/ g TS) in den untersuchten Mikroalgen nach 14 tägiger Kultivierung (Bedingungen: SS-Medium, $V_R = 100 \text{ mL}$, $I = 110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm Luft, $n = 6$), Abbildung 8, S.36

Mikroalge	PC		Ax		Adonix		Lutein		Adonirub.		Canthax.		β -Carotin		ME		DE		Car _{ges.}	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<i>S. falcatus</i>	0,01	0,01	0,01	0	0,03	0,01	0,01	0,01	0	0	0,03	0,01	0	0	0,01	0,01	0	0	0,10	0,1
<i>D. subspicatus</i>	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,22	0,03	0,01	0,01	0,06	0,02	0	0	0,47	0,05
<i>D. denticulatus</i>	0,07	0,01	0,02	0,01	0,31	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,07	0,01	0,11	0,02	0,08	0,01	0,74	0,04
<i>S. obliquus</i>	0,03	0,01	0,10	0,01	0,32	0,02	0,08	0,02	0	0	0,05	0,01	0,1	0,01	0,12	0,02	0,03	0,01	0,82	0,08
<i>S. accuminatus</i>	0,06	0,01	0,06	0,01	0,24	0,01	0,20	0,01	0,08	0,01	0,27	0,02	0	0	0,01	0,01	0,03	0,01	0,95	0,07
<i>S. costatus</i>	0,11	0,02	0,11	0,02	0,36	0,02	0,17	0,02	0	0	0,32	0,03	0	0	0,49	0,03	0,06	0,01	1,61	0,13
<i>S. vacuolatus</i>	0,04	0,01	0,22	0,02	0,27	0,05	0,36	0,03	0,04	0,01	0,51	0,05	0,15	0,02	0,87	0,05	0,23	0,01	2,71	0,05
<i>S. rubescens</i>	0,01	0,01	0,36	0,03	1,13	0,08	0,32	0,05	0,03	0,01	1,2	0,09	0,5	0,19	0,81	0,14	0,11	0,08	4,47	0,16
<i>S. producto capitatus</i>	0,1	0,01	0,19	0,01	0,7	0,02	0,41	0,04	0	0	3,1	0,17	0,22	0,10	0,30	0,1	0,08	0,04	5,37	0,11
<i>B. braunii</i>	0	0	0,05	0,01	0,47	0,03	0,13	0,02	0,08	0,01	3,29	0,06	0	0	1,20	0,1	0,47	0,04	5,69	0,1
<i>P. botryoides</i>	0	0	0	0	0,19	0,03	0,21	0,05	0	0	0,42	0,03	0,19	0,06	3,33	0,12	1,87	0,08	6,12	0,27
<i>C. striolata</i>	0,13	0,02	0,35	0,05	1,08	0,06	0,46	0,03	0,23	0,04	2,52	0,13	0,28	0,07	2,56	0,13	0,71	0,02	8,26	0,14
<i>T. wisconsinensis</i>	0,15	0,02	0	0	1,59	0,1	0,30	0,02	0,22	0,05	8,77	0,18	1,07	0,11	4,81	0,11	0,94	0,1	17,85	0,19
<i>M. zofingiensis</i>	0	0	0,45	0,02	1,00	0,07	0,38	0,04	0,09	0,02	4,91	0,16	1,98	0,14	5,87	0,17	3,71	0,1	18,39	0,16
<i>H. pluvialis</i>	0	0	0,04	0,01	0,04	0,01	0,1	0,01	0,02	0	0,4	0,06	0,21	0,03	14,85	0,13	4,56	0,16	20,22	0,17

PC (Violaxanthin, Neoxanthin), Ax: Ax, Adonix.: Adonixanthin, Adonirub.: Adonirubin, ME: Σ Monoester, DE: Σ Diester

Tabelle 28 : Carotinoidgehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach 14 Tagen Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 100$ mL, 25°C , 3,3 vvm Luft +2% CO_2 , n=6), Abbildung 34, S. 63

	150		250		350		525		700		875		1050		1125		1400	
Carotinoide	MW	SD																
PC	0,09	0,02	0,14	0,02	0,19	0,04	0,10	0,01	0,05	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ax	0,55	0,03	0,5	0,08	0,52	0,02	0,51	0,04	0,47	0,08	0,40	0,07	0,36	0,09	0,32	0,11	0,31	0,14
Adonix	1,50	0,15	1,68	0,13	1,90	0,13	1,78	0,19	1,61	0,04	1,40	0,28	1,23	0,11	1,01	0,14	0,88	0,09
Lutein	0,21	0,1	0,39	0,05	0,58	0,09	0,45	0,12	0,30	0,1	0,31	0,17	0,32	0,08	0,30	0,12	0,33	0,07
Adonirub	0,00	0	0,03	0,01	0,06	0,01	0,09	0,02	0,12	0,03	0,08	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01
Cx	1,95	0,32	1,87	0,34	1,78	0,22	1,67	0,2	1,60	0,26	1,54	0,18	1,52	0,11	1,50	0,1	1,45	0,12
Car-ME	0,66	0,09	1,29	0,19	1,54	0,18	1,22	0,24	1,04	0,25	0,92	0,09	0,82	0,07	0,72	0,18	0,66	0,09
Car-DE	0,12	0,07	0,16	0,05	0,26	0,1	0,24	0,08	0,19	0,05	0,15	0,04	0,18	0,1	0,14	0,1	0,11	0,09
β -Carotin	0,67	0,17	1,27	0,42	1,79	0,41	1,54	0,19	1,10	0,16	0,85	0,21	0,75	0,07	0,54	0,13	0,48	0,15
Summe	5,76	0,21	7,33	0,18	8,62	0,3	7,60	0,16	6,49	0,32	5,68	0,19	5,23	0,18	4,55	0,19	4,25	0,22

Tabelle 29 : Veränderung der Pigmentzusammensetzung (%) in *H. pluvialis* während der Stressexposition (Bedingungen: PET-Medium, $V_R = 2$ L, 25°C , 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n=9$), Abbildung 30, S.59

Zeit in d	0		3		6		9		15		27		46	
	MW	SD												
Violax/ Neox	11,3	0,6	5,2	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ax	0	0	2,8	0,1	0,5	0,2	0,9	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1
Adonix	0	0	0	0	0,8	0,2	1,0	0,2	0,6	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1
Lutein	34,8	1,7	20,7	0,9	6,1	0,5	3,1	0,3	2,1	0,4	0,5	0,1	0,2	0,1
Cx	0	0	0	0	1,3	0,1	1,3	0,1	1,6	0,2	2,6	0,3	2,1	0,3
b-Car	9,79	0,3	4,8	1,4	3,8	0,4	2,2	0,4	1,6	0,5	1,3	0,2	1,3	0,2
Chl.	44,1	2,3	20,3	2,5	5,0	0,2	3,4	0,5	1,6	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2
Summe ME	0	0	36,7	1,5	68,0	2,8	70,9	3,1	74,8	2,7	73,8	2,5	74,0	1,2
Ax DE	0	0	9,5	1,0	15,6	1,9	16,1	1,1	16,5	1,9	19,8	1,4	17,9	1,0
Summe	100		100		100		98,8		99,0		98,8		96,8	

Tabelle 30 : Veränderung der Carotinoidzusammensetzung (%) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 2$ L, 25°C , 3,3 vvm Luft + 2% CO_2 (v/v), $n=6$), Abbildung 33, S. 62

	PC		Lutein		b-Car		Ax		Adonix		Cx		Adonir		ME		DE	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2	30,9	1,8	38,9	2,2	30,2	1,4	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
4	30,9	0,9	35,7	2,9	29,8	1,3	1,0	0,2	0,8	0,1	0,7	0,1	0,0	0	1,0	0,1	0,0	0
6	35,0	1,1	30,9	1,8	19,0	0,7	3,8	0,4	6,4	0,3	3,3	0,2	0,7	0,0	0,8	0,1	0,0	0
8	31,5	2,8	26,6	1,9	17,8	0,5	5,3	0,4	7,3	0,5	5,5	0,3	1,5	0,3	4,5	0,6	0,0	0
10	26,2	1,5	21,1	1,1	19,1	1,1	5,1	0,5	11,8	0,3	5,5	0,4	1,6	0,2	8,9	0,4	0,8	0,1
12	13,4	1,4	16,2	1,4	21,9	1,2	5,8	0,2	19,0	0,9	9,1	0,2	2,1	0,1	11,6	0,5	0,9	0,1
14	8,4	0,8	13,9	0,9	20,4	0,7	6,2	0,3	23,4	1	10,0	1	1,9	0,1	14,2	0,3	1,6	0,2
16	3,2	0,4	10,5	1	19,2	0,5	7,0	0,6	29,4	1,1	10,8	0,7	1,6	0,4	15,8	0,8	2,4	0,1
19	3,6	0,4	9,3	0,7	14,5	0,8	7,1	0,4	29,1	1,4	12,8	0,4	1,5	0,2	18,1	0,3	4,0	0,5
21	0,0	0	7,7	0,5	14,5	0,6	6,6	0,2	31,3	0,9	15,0	1,4	1,7	0,3	17,6	0,4	5,6	0,3
27	0,0	0	7,4	0,5	14,4	0,8	6,0	0,3	31,0	1,6	16,0	0,9	1,4	0,1	17,8	0,4	6,0	0,2
46	0,0	0	6,6	0,4	10,7	0,4	5,7	0,4	29,5	1,5	16,9	0,9	1,5	0,2	20,5	0,5	8,6	1,0

Tabelle 31 : Carotinoidgehalt (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Lichtzusammensetzung nach 14 Tagen Kultivierungszeit (Bedingungen während der Stressexposition: SS-Medium, $V_R = 2\text{ L}$, 25°C , 3,3 vvm Luft+2% CO_2 , $n=6$), Abbildung 35, S.65

Carotinoide	„Warm White“		Blau		UV	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
PC	0,17	0,04	0,11	0,05	0,14	0,06
Ax	0,22	0,1	0,35	0,07	0,44	0,15
Adonix	0,80	0,09	0,73	0,08	1,43	0,22
Lutein	0,22	0,05	0,27	0,09	0,34	0,15
Adonir	0,03	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01
Cx	1,67	0,32	2,33	0,3	1,88	0,21
ME	0,95	0,2	1,00	0,15	1,07	0,07
DE	0,22	0,11	0,14	0,04	0,13	0,05
β -Carotin	0,70	0,13	0,89	0,12	1,32	0,21
Summe	4,99	0,15	5,85	0,13	6,78	0,34

Tabelle 32 : Carotinoidgehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von Nitrat- und Phosphatmangel sowie NaCl- und KCl-Einfluss nach 14 Tagen Kultivierungszeit; S = Setlik-Medium, N = Nitratmangel, P = Phosphatmangel, Instant Ocean: künstliches Meersalz (N, P, 569 mM NaCl) (Bedingungen während der Stressexposition: $V_R = 100\text{ mL}$, $I = 350\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 25°C , 3,3 vvm Luft +2% CO_2 , $n=6$), Abbildung 36, S.66

Car.	S-N		S-P		S-N-P		S-N-P+ KCl		S-N-P+ NaCl		S-N-P+ NaCl+KCl		Instant Ocean	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
PC	0,75	0,1	0,10	0,05	0,38	0,1	0,44	0,07	0,27	0,09	0,43	0,12	0,11	0,03
Ax	0,15	0,08	0,08	0,02	0,31	0,09	0,43	0,1	0,38	0,05	0,56	0,17	0,97	0,15
Adonix	0,79	0,24	0,29	0,1	1,33	0,37	1,34	0,26	1,31	0,14	1,61	0,24	3,41	0,51
Lutein	0,58	0,14	0,35	0,17	0,33	0,11	0,62	0,11	0,36	0,1	0,52	0,1	0,53	0,14
Adonir	0,03	0,01	0	0	0,03	0,01	0,03	0,02	0	0	0,03	0	0,05	0,01
Cx	1,14	0,31	0,24	0,09	1,89	0,28	2,35	0,49	2,67	0,37	2,93	0,29	3,09	0,22
ME	0,96	0,18	0,28	0,07	1,70	0,15	1,36	0,31	1,95	0,4	1,53	0,14	3,07	0,43
DE	0,30	0,1	0,03	0,01	0,43	0,11	0,24	0,07	0,41	0,08	0,24	0,03	0,27	0,09
β -Car.	1,81	0,44	1,18	0,27	1,97	0,25	1,65	0,25	1,54	0,26	1,54	0,11	1,46	0,15
Summe	6,53	0,35	2,56	0,21	8,37	0,43	8,47	0,29	8,89	0,36	9,41	0,21	12,96	0,38


```

07rev      CTGGGAGCACCACAGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
09rev      CTGGGAGCACCACAGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGG
010rev     CTGGGAGCACCACAGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGG
H9uni      CTGGGAGCATCATAGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
H10uni     CTGGGAGCATCATAGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
011uni     CTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
H12uni     CTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
h12revrc   CTGGGAGCATCACCGCTGGCC-TTCGCCCCCTGGTGG
012unirc   CTGGGAGCATCATAGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
***** ** ***** ** *****
    
```

Mastersequenz H12 uni (5'→3') des *BKT*-Fragmentes aus *S. producto capitatus*

CATTGGGAACACCACAACCATACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGA
 GATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGRAAGGGTACATAAGTATCCCTCAA
 TTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCATGTACTATGGTGCCCCCTGCCAAC
 ATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTAGTGTGAGCAGTGCAGTGTCTACTATGGC
 ACGTACGTCANCCACAAGCCAGGAAGGGTGTGATGAAGTATGTCGTGGGCGAAGGCA
 AGGTGCGCAATGGCGCCATCTGCGCTGAGTTTCTGCGGTGTTATTTCTTCGACATGCAC
 TGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG

Nukleotidsequenzen der 5'-RACE-PCR Klone der *BKT* aus *S. producto capitatus*

Klon-Nr.	Nukleotidsequenz (5'→3')
B5 uni	TTTGCTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTCGCG TGAATTTGTGATCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTAAGTGTCTGCCGTTGTTACCTAAA CTGGAAGTATTCCCTACACGATGATGCAGGCTAAGAACTGGAGCAGGCTGCAGGGCAGCTGT AGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTCATGCCAGGTCGTT GCAATGCTTCAGCTTGTCTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGGCGCAGCAGGAGA CGCACGAGGTCGTTGACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGCC TACAGCAGCAGCAGCAGCAACCGGGGGGATTTCGAAACCCAGCAGAAGAAGTGGGCAG TTGGCTTGAACAGTATGCAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACT ACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATACTCTCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTT GCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGTCTTGTTCAGCATGCAATTTGGGGCTA CGATATGTTTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGC TGGAGTTTGTAGCACCAGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACA CCCAACAAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTT TGACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACGACAACACGGGACAGCCCCATG AAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGAAA GGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTCCCTCATGTACTA TGGTGCCCCCTGCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA
5512 M13	TGATGTCGTGATCATATGCGCTGCGTTACTCTTTGCAGATGACTCCATGCATGGTACAGTCA CACCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGG TTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCA TGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGTGAGTGGACACAAAAGAATACGCAACCGTGACACCATC TAATACTGGCATGAGAGGCATCATCATCTTCAAGGACCGTAGGATGTTGAAATGATCGCTG TGTGTTCTGTTGGGCAACACTGCCCGTCATACTGAGTAGTCATGGGCAATACTGCACTGTA TCGTACACTGTTGCTTACTGTATTACTGAGAGCACTCGCAGGTGGTATCGTGTGCAGCACGC TGTTTAGAGAACACAATAATGGTAGTGCTTGGTTTTGTCAAGCATGCTCGCTCAATGAGTAG CATATAACACATCGTTTGCAGCGAGTATGTTTGCAGCGAGTATGCCTCAAGAGTGTGCATGGC AGTAAGTACGCCTAAGCATGCAAAAGCTGGTTACAGGTCTTACTGCGACTGGTGCAAGGGCA GGTGCTTGCAGGCTAATCACTCCCATGATCTCACAAGAGACGAACCTGCAATGTGGCTTT TTTTGCAGGAGATCCAGCCTTGTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGAAAGGGTACATAAGT ATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACTATGGTGCCCCCT GCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCAGTGTGAGCAGTGCAGTGTCTACT ATGGCACGTACGTGCCACA

Klon-Nr.	Nukleotidsequenz (5'→3')
5513 M13	TGATGTCGTGATCATATGCGCTGCGTTACTCTTTGCAGATGACTCCATGCATGGTACAGTC ACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTT GGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCC CCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGTGTAGTGGACACAAAAGAATACGCAACCGTGACAC CATCTAATACTGGCATGAGAGGCATCATCATCTTCAAGGACCGTAGGATGTTTGAATGAT CGCTGTGTGTTCTGTTGGGCAAACACTGCCCGTCATACTGAGTAGTCATGGGCAATACTGC ACTGTATCGTACACTGTTGCTTACTGTATTACTGAGAGCACTCGCAGGTGGTATCGTGTGC AGCAGCGTGTTTAGAGAACAACAATAATGGTAGTGCTTGGTTTGTCAAGCATGCTCGCTCA ATGAGTAGCATATAACACATCGTTTGCAGCGAGTATGTTTGCAGCGAGTATGCCTCAAGAG TGTCATGGCAGTAAGTACGCCTAAGCATGCAAAAAGCTGGTTACAGGCTTACTGCGACTGG TGCAAGGGCAGGTTGCTTGGCGGGCTAATCACTCCCATGATCTCACAAGAGACGAACCTGC AATGTGGCTTTTTTTTTGCAGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGAAA GGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACT ATGGTGCCCCCTGCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTGAGGCCAGTGTGACGAGT GCGACTGTTCTACTATGGCACGTACGTGCCACA
5517	TGATGTCGTGATCATATGCGCTGCGTTACTCTTTGCAGATGACTCCATGCATGGTACAGTCA CACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGG TTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAACACCACAACCATAACGGGACAGCCCCA TGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGR AAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTAC TATGGTGCCCCCTGCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTGAGGCCCTAGTGTGACGAGT GCGACTGTTCTACTATGGCACGTACGTANCCACAAGCCCAGGAAGGGTGCTGATGAAGTGA TGTCGTGGGCGAAGGCAAGGTGCGCAATGGCGCCATCTGCGCTGAGTTTTCTGCGGTGTTAT TTCTTCGACATGCACTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
5523	CGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAAAAAGCCTACAGCAGCAG CAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTTCGCAAACCCAGCAGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAAC AGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGG CGTGACCTACAATTGGCATACTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGTGCTAT GGGCTTGTACTGCTTGGGCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTG CACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGT AGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCG CTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTACTACAGCA TGATGTGGACGAAACATTGGGAACACCACAACCATAACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGAC TTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGRAAGGGTACATAAG TATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACTATGGTGCCCCC TGCCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTGAGGCCCTAGTGTGACGAGTGCAGTGTCTAC TATGGCACGTACGTANCCACAAGCCCAGGAAGGGTGCTGATGAAGTATGTCGTGGGCGAA GGCAAGGTGCGCAATGGCGCCATCTGCGCTGAGTTTTCTGCGGTGTTATTTCTTCGACATGC ACTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
5524	TGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACAATGATGGGTCTTACTACAGCA GTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCT GCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGCCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATAT GTTTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGT TTGTTAGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAAC AATCGCATTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTACTA CAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAACACCACAACCATAACGGGACAGCCCCATGAAGATC CAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGRAAGGGTAC ATAAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACTATGGTGC CCCCCTGCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTGAGGCCCTAGTGTGACGAGTGCAGTGT TCTACTATGGCACGTACGTANCCACAAGCCCAGGAAGGGTGCTGATGAAGTATGTCGTGG GCGAAGGCAAGGTGCGCAATGGCGCCATCTGCGCTGAGTTTTCTGCGGTGTTATTTCTTCGA CATGCACTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG
5527	AACTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCGGCAGCAGGAGACGCACGAGGTCCGTGTACCGGACCTTC CCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAACGCG GAGGGATTTCGCAAACCCAGCAGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGA TGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGG CATATCTCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCT TGGGCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGCACCGATGACCGTGCC ACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACCGGGCTCTTCA TCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTG

Klon-Nr.	Nukleotidsequenz (5'→3')
	<p>ATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAACA TTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATC CAGCCTTGCTGCCTTGGTTTTCTGAGTTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTG AAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTTCTCATGTACTATGGTGCCCCCTGCCCAACATGCTGCT GTTTTGGGCTGGGTACAGCCTA</p>
6013	<p>TGGGGCTGGCTACAGACTAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTGCG GTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTAAGTGTCTGCCGTTGTTACCTAA ACTGGAAGTATTCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGGCAGCTG TAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGCCAGGTGCT TGCAATGCTTTCAGCTTGTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCGGGGCTGGTGCGGCAGCAGG ACGCAGGAGTCCGTGTACCCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGC CTACAGCAGCAGCAGCAGCAACCGGAGGGATTTCGCAAACCCAGCAGAAGAAGTGGGCA GTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTAC TACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGTCAAATCTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTT TGCCGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCT ACGATATGTTTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCG CTGGAGTTTGTAGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCAC ACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGT TTGACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCAT GAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGTCTTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAA AGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGAGCTGCAGCCACAGTACTGTCTCATGTACTATG GTGCCCCCTGCCCAACATGCTGCTGTTTTGGCTGGTCAGCTA</p>
6014	<p>CTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTGCGGTGAATTTG TGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTAAGTGTCTGCCGTTGTTACCTAAACTGGAAAGT ATTCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGGCAGCTGTAGCACCTT GGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGCCAGGTGCTTGAATGCT TCAGCTTGTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCGGCAGCAGGAGACGCACGAG GTCCGTTGACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAAAGGCTACAGCAG CAGCAGCAGCAGCAACCGGAGGGATTTCGCAAACCCAGCAAAAGAAGTGGGCACTTGGCTTG AACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTACAGCAGT AGGCGTGACCTACAATTGGCATAATCTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGC TATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGT TTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTT GTTAGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCTTGGTACAGTCACACCCAACAA TCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTGTGACTACA GCATGATGTGGACGAAACATTGGGAACACCACAACCATAACGGGACAGCCCCATGAAGATCCA GACTTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGTGCCTTGGTTTCTGAGTTTTATGRAAGGGTACAT AAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCTCATGTACTATGGTGGCC CCCTGCCCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTACAGCCTAGTGTGAGCAGTGCAGCTGTTT TACTATGGCACGTACGTANCCACAAGCCCAGGAAGGGTGTGATGAAGTGTGCTGCTGGGC GAAGGCAAGGTGCGCAATGGCGCCATCTGCGCTGAGTTTCTGCGGTGTTATTTCTTCGCAT GCACTGGGAGCATCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGG</p>
6015	<p>CTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTGCGGTGAA TTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTAAGTGTCTGCCGTTGTTACCTAAACAGG AAGTATTCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGGCAGCTGTAGCA CCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGCCAGGTGCTTGC TGCTTTCAGCTTGTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCGGCAGCAGGAGACG CGAGGTCCGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGCCTACA GCAGCAGCAGCAGCAGCAATGCGGAGGGATTTCGCAAACCCAGCAGAAGAAGTGGGCACTTGG CTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTACAG CAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATAATCTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTG CTGCTATGGGCTTGATCTCTGCTTGGGCGTGCTTGTTCGAAGCATGCAATTTGGGGCTACGAT ATGTTTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGA GTTTGTTAGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCA ACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTGAC TACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGA TCCAGACTTCCGCAAGGGAGATCCAGCCTTGTGCCTTGAATTTCTGAGTTTTATGAAGGTAC ATAAGTATCCCTCAATTTGTGAGCTGCAGGCCACAGTACTGTCTCATGTACTATGTGCCCC CTGCCACATGCTGCTGTTTTGGCTGGTCAGCTA</p>
6021	<p>TGGCTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTGCGGT GAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTAAGTGTCTGCCGTTGTTACCTAAAC</p>

Klon-Nr.	Nukleotidsequenz (5'→3')
	<p>TGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGCTGGAGCAGGCTGCAGGGCAGCTGTA GCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGCCAGGTCGTTG CAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCGGCAGCAGGAGAC GCACGAGGTCCGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGCCT ACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTTCGAAAACCCAGCAGAAGAAGCTGGGCAGT TGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTA CAGCAGTAGGCGTGACCTACGATTGGCATATCTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTG CTGCTGCTATGGGCTTGATCATTGCTTGGGCGTGCTTGTTC AAGCATGCAATTTGGGGCTAC GATATGTTTTGCACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCT GGAGTTTTGTAGCACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACAC CCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGTTTT GACTACAGCATGATGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGA CGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTTCTGAGTTTTATGAAAG GGTACATAGTATCCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACTATGG TGCCCCCTGCCACATGCTGCTGTTTTGGCTGGGTCAGGCCTA</p>
6026	<p>CAAGCGAAACGCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGCCAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCT TGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCGGCAGCAGGAGACGCACGAGGTCCGT GTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCACTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAG CAGCAGCAACGCGGAGGGATTTCGAAAACCCAGCAGAAGAAGCTGGGCAGTTGGCTTGAACAGT ATACAATGCCAGATGAGATGAGCCTGTGGGACGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGT GACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAAGTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGG CTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTTC AAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGCAC CGATGACCGTGCCACACCTTCTTGATGGCCTGTTGACCTACGCTTCGCTGGAGTTTTGTTAGC ACCGGGCTCTTCATCACAACACATGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTT TTTGAATGATGTGATTGGCGCGACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTTGACTACAGCATGA TGTGGACGAAACATTGGGAGCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTC CACAAGGGAGATCCAGCCTTGCTGCCTTGGTTTTCTGAGTTTTATGAAAGGGTACATAAGTAT CCCTCAATTTGTGAAGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCCTCATGTACTATGGTGCCCCCTGC CCAACATGCTGCTGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA</p>

Multiples CLUSTAL W (2.0.5) Teilsequenz-Alignment der 5'-RACE-PCR der *BKT* aus *S. producto capitatus* auf Nukleotidebene

Der rote Bereich markiert den Start der BKT-Nukleotidsequenz vor der 5'RACE PCR.

6013	TGGGGCTGGCTACAGACTAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTC	60
6015	-----CTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTC	55
5523	-----	
5524	-----	
6026	-----	
5527	-----	
B5	-TTTGCTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTC	59
6021	--TGGCTGGCTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTC	58
6014	-----CTACAGACCAGAAGTAGCGGGTACAGAGATTGCTTTGTAAAGTGCCCGGTC	51
6013	GCGTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTACTGTCTGCCGTTGTTTAC	120
6015	GCGTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTACTGTCTGCCGTTGTTTAC	115
5523	-----	
5524	-----	
6026	-----	
5527	-----	
B5	GCGTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTACTGTCTGCCGTTGTTTAC	119
6021	GCGTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTACTGTCTGCCGTTGTTTAC	118
6014	GCGTGAATTTGTGATCCCCTTTCTCTAGCGCCTTGCAAGGTACTGTCTGCCGTTGTTTAC	111
6013	CTAAACTGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGG	180
6015	CTAAACAGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGG	175
5523	-----	
5524	-----	
6026	-----	
5527	-----	
B5	CTAAACTGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGG	179
6021	CTAAACTGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGG	178
6014	CTAAACTGGAAGTATTCCCTTACACGATGATGCAGGCTAAGAAGTGGAGCAGGCTGCAGGG	171
6013	CAGCTGTAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	240
6015	CAGCTGTAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	235
5523	-----	
5524	-----	
6026	-----CAAGCGGAAACGCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	39
5527	-----	
B5	CAGCTGTAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	239
6021	CAGCTGTAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	238
6014	CAGCTGTAGCACCTTGGGTTGCAAGCGGAACGCCGTGTCCAGCACAGGCCCTTTGCATGC	231
6013	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	300
6015	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	295
5523	-----	
5524	-----	
6026	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	99
5527	-----AACTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	24
B5	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	299
6021	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	298
6014	CAGGTCGTTGCAATGCTTCAGCTTGTTTTCTGAAACAACCTTCTCAGCCAGGGCTGGTGCG	291
6013	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	360
6015	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	355
5523	-----CGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	38
5524	-----	
6026	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	159
5527	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	84
B5	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	359
6021	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	358
6014	GCAGCAGGAGACGCACGAGGTCGGTGTACCGGACCTTCCCCAGCACCATGAGCAGCAGCA	351

6013 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 420
 6015 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAATGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 415
 5523 CTCATCAAAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 98
 5524 -----
 6026 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 219
 5527 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 144
 B5 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGGGGATTGCGAAACCCAGC 419
 6021 CTCATCAGAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 418
 6014 CTCATCAAAAGCCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACGCGGAGGGATTGCGAAACCCAGC 411

6013 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 480
 6015 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 475
 5523 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 158
 5524 -----TGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 39
 6026 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCAGATGAGATGAGCCTGTGGGA 279
 5527 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 204
 B5 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATGCAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 479
 6021 AGAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 478
 6014 AAAAGAACTGGGCAGTTGGCTTGAACAGTATAACAATGCCTGATGAGATGAGCCTGTGGGA 471

6013 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGTCAAATCTCCCACCCAA 540
 6015 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 535
 5523 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 218
 5524 CAATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 99
 6026 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 339
 5527 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 264
 B5 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 539
 6021 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACGATTGGCATATCTCCCACCCAA 538
 6014 CGATGATGGGTCTTACTACAGCAGTAGGCGTGACCTACAATTGGCATATCTCCCACCCAA 531
 * *****

6013 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 600
 6015 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCTCTGCTTGGGCGTGCTTGTT 595
 5523 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 278
 5524 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 159
 6026 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 399
 5527 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 324
 B5 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 599
 6021 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 598
 6014 GTCCGACCTGCCTGGCTTTGCTGCTGCTATGGGCTTGATCACTGCTTGGGCGTGCTTGTT 591

6013 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 660
 6015 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 655
 5523 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 338
 5524 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 219
 6026 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 459
 5527 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 384
 B5 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 659
 6021 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 658
 6014 CAAGCATGCAATTTGGGGCTACGATATGTTTGACCGATGACCGTGCCACACCTTCTTGA 651

6013 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 720
 6015 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 715
 5523 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 398
 5524 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 279
 6026 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 519
 5527 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 444
 B5 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 719
 6021 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 718
 6014 TGGCCTGTTGACCTTCGCTTCGCTGGAGTTTGTAGCACC GGCTCTTCATCACAACACA 711

6013	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	780
6015	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	775
5523	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	458
5524	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	339
6026	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	579
5527	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	504
B5	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	779
6021	TGACTCCATGCATGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	778
6014	TGACTCCATGCTTGGTACAGTCACACCCAACAATCGCTTTTTGAATGATGTGATTGGCGC	771

6013	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	840
6015	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	835
5523	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	518
5524	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	399
6026	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	639
5527	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	564
B5	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	839
6021	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	838
6014	GACGTGCATTAGCCTGTACGCTTGGTTTGACTACAGCATGATGTGGACGAAA	831

6013	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGT	900
6015	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	895
5523	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	578
5524	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	459
6026	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	699
5527	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	624
B5	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	899
6021	GCACCACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	898
6014	GCAC-ACAACAACACGGGACAGCCCCATGAAGATCCAGACTTCCACAAGGGAGATCCAGC	888
	**** * ***** * *****	
6013	CTTTGCTGCCTTGGTTTCTGAGTTT-ATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	959
6015	CTT-GCTGCCTTGATTTCTGAGTTT--TATGAAAGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	952
5523	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	637
5524	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	518
6026	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	758
5527	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	683
B5	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATAAGTATCCCTCAATTTGTGA	958
6021	CTT-GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATGAAAGGGTACATA-GTATCCCTCAATTTGTGA	956
6014	TT--GCTGCCTTGGTTTCTGAGTTTATG--AAGGGTACATAAGTATCCCTCA--TTTGTGA	944
	* ***** * *****	
6013	-GCTGCAG-CCACAGTACTGT-CCTCATGTACTATGGTGCCCCC-TGCCCAACATGCTGC	1015
6015	-GCTGCAGGCCACAGTACTGT-CCTCATGTACTATG-TGCCCCC-TGCCCA-CATGCTGC	1007
5523	AGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCCCTGCCCAACATGCTGC	697
5524	AGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCCCTGCCCAACATGCTGC	578
6026	AGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCCCTGCCCAACATGCTGC	818
5527	AGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCCCTGCCCAACATGCTGC	743
B5	AGCTGCAGGCCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCCCTGCCCAACATGCTGC	1018
6021	AGCTGCAG-CCACAGTACTGTTCCTCATGTACTATGGTGCCCCC-TGCCCA-CATGCTGC	1013
6014	-GCTGCAG--CACAGTACTGT--CTCATGTACTATG-TGCCCT---GCTAACATGCTGC	995
	***** ***** ***** ***** * * *****	
6013	TGTTTTGG--CTGGTCAG--CTA-----	1034
6015	TGTTT-GG--CTGGTCAG--CTA-----	1025
5523	TGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA-----	720
5524	TGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA-----	601
6026	TGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA-----	841
5527	TGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA-----	766
B5	TGTTTTGGGCTGGGTCAGGCCTA-----	1041
6021	TGTTTTGG-CTGGGTCAGGCCTA-----	1035
6014	TGTTTTGGCTGTCAGCCTAGTGTGTCAGCAGTGGCGACTGTTCTACTATGAGTTACGTGCCACC	1055
	***** * * *	

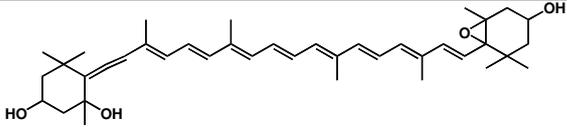
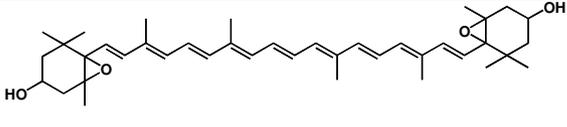
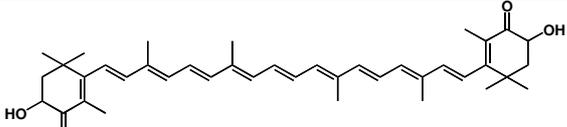
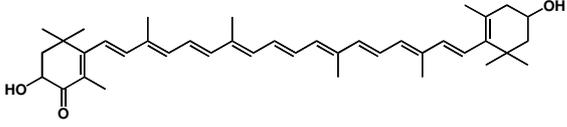
5523	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	193
5524	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	153
5527	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	208
6026	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	233
B5	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHDNTGQPHEPDFHKGDP	297
6013	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	297
6021	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFHKGDP	296
6015	DSMHGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWFDYSMMWTKHWEHHNNTGQPHEPDFRKGDP	295
6014	DSMLGTVTPNNRFLNDVIGATCISLYAWCDYSMMWTKHWEHHTTRDSPMKTQTSQGPAC	294
	*** *****:***** ***** . . . * . : . .	
5523	LLPW-----FLSFMKGYISIPQFVKLQATVLFMLYYGAPLPNMLLF-----	234
5524	LLPW-----FLSFMKGYISIPQFVKLQATVLFMLYYGAPLPNMLLF-----	194
5527	LLPW-----FLSFMKGYISIPQFVKLQATVLFMLYYGAPLPNMLLF-----	249
6026	LLPW-----FLSFMKGYISIPQFVKLQATVLFMLYYGAPLPNMLLF-----	274
B5	LLPW-----FLSFMKGYISIPQFVKLQATVLSLMLYYGAPLPNMLLF-----	338
6013	FAAL-----VSEFMKGYISIPQFVSCSHST-VLMYYGAPCPTCCCF-----	337
6021	LLPW-----FLSFMKGYIVSLNL-SCSHSTVPHVLW-CPLPTCCCF-----	335
6015	LLP-----FLSFMK-VHKYPSICELQATVLSSTCM-CPLPTCCCL-----	333
6014	CLGLF-VL-RVHKYPSFVSCSTVLSHVLCPANMLLFGCQPSVSSATVLL-VTCHQARGLM	351
	. * : :	
5523	----WAGSGL	240
5524	----WAGSGL	200
5527	----WAGSGL	255
6026	----WAGSGL	280
B5	----WAGSGL	344
6013	----GWSA--	341
6021	----GWVRP--	340
6015	----AGQL--	337
6014	SEFSHWAAGL	361

Anhang E – Analytische Daten

Tabelle 33 : Koeffizienten und Referenzwerte für die mittels HPLC analysierten Carotinoid-Referenzsubstanzen, Kalibrierung mit externer Standardmethode, Bestimmung der Nachweisgrenze S/N = 3

Carotinoid	k	Nachweisgrenze (µg/ L)	Korrelationskoeffizient r	λ_{\max} Ethanol, 25°C
Neoxanthin	0,76	321	0,9963	(415) 439 (467)
Violaxanthin	1,04	293	0,9924	(419) 440 (470)
Ax	2,91	221	0,9993	478
Adonixanthin	3,40	180	0,9964	465
Lutein	3,62	179	0,9961	(422) 445 (474)
Zeaxanthin	3,69	158	0,9992	(428) 450 (478)
Adonirubin	3,87	240	0,9940	478
Cx	5,58	110	0,9948	474
Echinenon	7,87	127	0,9999	461
β,β -Carotin	9,24	185	0,9992	450 (476)

Tabelle 34 : Theoretische und experimentell ermittelte Massen der Carotinoide (Referenzsubstanzen) mittels (APCI)⁺-MS

Carotinoid	Strukturformel	SF ($M_{\text{theoretisch}}$)	m/z _{exp.}	rel. Isotopenhäufigkeit (%)
Neoxanthin		$C_{40}H_{56}O_4$ (600,42)	601,2 583,2 565,2	100 97,2 44,4
Violaxanthin		$C_{40}H_{56}O_4$ (600,42)	601,2 583,2 565,2	100 84,8 41,9
Astaxanthin		$C_{40}H_{52}O_4$ 596,39	597,3	100
Adonixanthin		$C_{40}H_{54}O_3$ 582,41	583,1	100

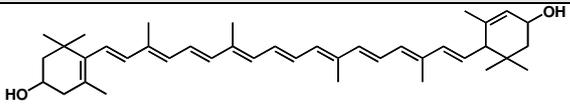
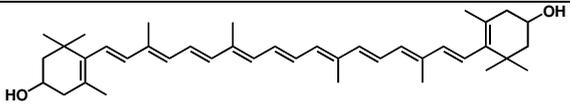
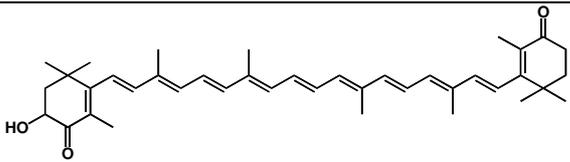
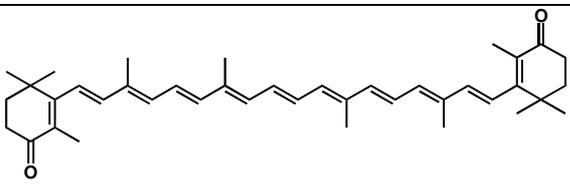
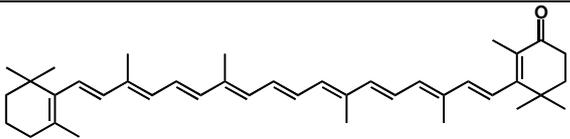
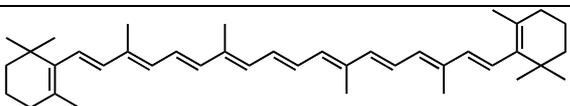
Carotinoid	Strukturformel	SF ($M_{\text{theo-retisch}}$)	$m/z_{\text{exp.}}$	rel. Isotopenhäufigkeit (%)
Lutein		$C_{40}H_{56}O_2$ 568,43	551,1 569,1	100 23,7
Zeaxanthin		$C_{40}H_{56}O_2$ 568,43	569,1 551,1	100 41,9
Adonirubin		$C_{40}H_{52}O_3$ 580,39	581,8	100
Canthaxanthin		$C_{40}H_{52}O_2$ 564,4	565,0	100
Echinenon		$C_{40}H_{54}O$ 550,42	551,1	100
β -Carotin		$C_{40}H_{56}$ 536,44	537,1	100

Tabelle 35: Retentionszeiten (t in min) und Retentionsfaktoren (k) für S,S -Ax, Enantioselektivitäten (α) und die Auflösung (R) für die Enantiomere (S,S und R,R)

Eluent ($CH_3CN/ 3,5 \text{ mmol } H_3PO_4$ (pH = 2,6)) v/v	t (min)	k	$\alpha_{SS/RR}$	$R_{SS/RR}$
75/25	29,9	5,6	1,17	2,27
70/30	45,2	8,8	1,19	2,49
65/35	72,6	15,1	1,21	2,80

Anhang F – Zusätzliche Daten zur Steigerung des Ax-Gehaltes in *S. rubescens*

Beeinflussung der Sekundärcarotinoidgehalte durch Kultivierungsparameter

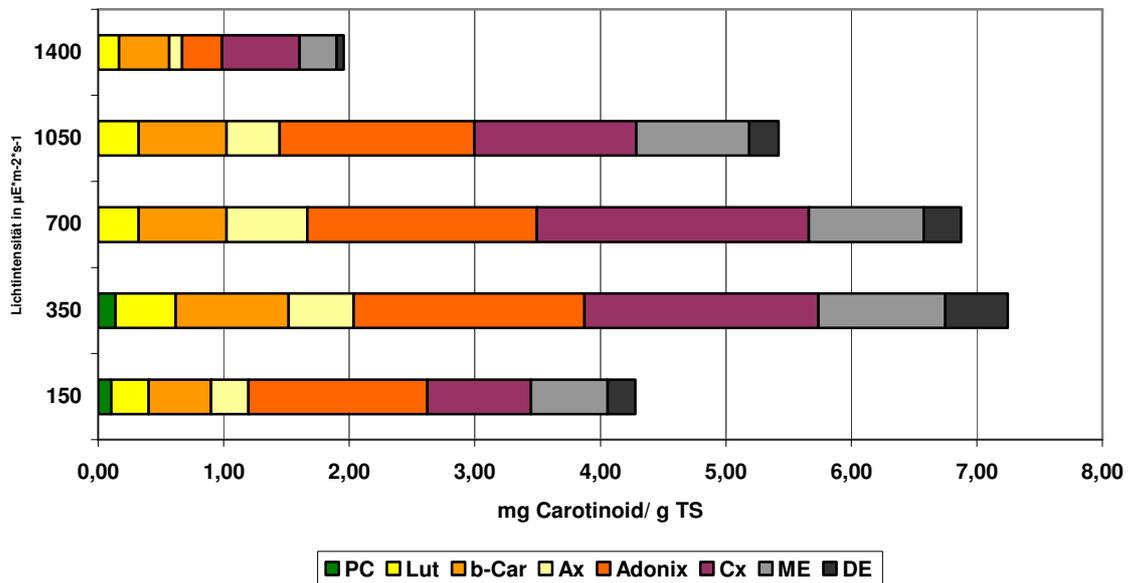


Abbildung 39: Carotinoidgehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach 14 Tagen Kultivierungszeit, (Bedingungen während der Stressexposition: aqua dest., $V_R = 100 \text{ mL}$, 25°C , 3,3 vvm Luft +2% CO_2 , n=6)

Tabelle 36 : SC-Gehalte (mg/ g TS) in *S. rubescens* in Abhängigkeit von Nitrat- und Phosphatmangel sowie NaCl-Einfluss nach 14 d Kultivierungszeit unter Schwachlicht ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Starklicht); S = Setlik-Medium, N = Nitratmangel, P = Phosphatmangel (Bedingungen während der Stressexposition: $V_R = 100 \text{ mL}$, 25°C , 3,3 vvm Luft +2% CO_2 , n=6)

Stressexposition	Lichtintensität	
	$70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
	SC mg/ g TS	SC mg/ g TS
S-N	0,0±0	6,53±0,35
S-P	0,0±0	2,56±0,21
S-N-P	0,1±0,05	8,37±0,43
S + 69 mM NaCl	0,04±0,01	0,1±0,02
S-N-P + 69 mM NaCl	4,38±0,25	8,89±0,36

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Astaxanthin-Biosynthese in den Grünalgen *Scenedesmus* sp. und *Haematococcus pluvialis*“ selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Teltow, 08.07. 2008

Claudia Grewe

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Carola Griehl möchte ich mich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit, ihr stetes Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit und für die Bereitstellung der Ausstattung bedanken. Sie gab mir die Möglichkeit meine Experimente frei zu gestalten und die Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Tagungen zu präsentieren.

Ich danke Herrn Prof. Gerd-Joachim Krauß für das Interesse an der Arbeit und ihrem Fortgang. Aus seiner Arbeitsgruppe möchte ich besonders Herrn Dr. Dirk Wesenberg für seine Diskussionsbereitschaft und Frau Dr. Sieglinde Menge für die lehrreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der chiralen HPLC-Trennungen danken.

Frau Dr. Sabine Rosahl danke ich für die Möglichkeit, alle molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in ihrem Labor durchzuführen. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, ohne ihr Engagement für das „Algenthema“ wären diese Arbeiten nicht denkbar gewesen. Des Weiteren bedanke ich mich stellvertretend bei Lennart und Simone, die mir mit vielen praktischen Hinweisen das Arbeiten enorm erleichtert haben, sowie bei Annet, die bereitwillig ihre „Buchte“ mit mir teilte. Ulrike möchte ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung einiger Ligations-, Transformations- und Präparationsansätze danken sowie für die Hilfe beim Northern Blot und der Sequenzierung der RACE-Klone.

Mein Dank gilt allen Kollegen, Kooperationspartnern und Freunden, ohne deren Unterstützung die erfolgreiche Anfertigung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders möchte ich mich bedanken bei:

Simone Bieler, für ihre offenen Ohren, die kontinuierliche Versorgung mit Literatur, das Korrekturlesen der Arbeit und den britischen Humor.

Herrn Prof. Thomas Friedl möchte ich für die Bereitstellung einiger Algenstämme danken sowie für seine Kooperationsbereitschaft.

Vielen Dank an Herrn Prof. Alfred Kolbe und seiner Frau für den Kontakt zur Synthesechemie und zur IR-Spektrometrie sowie für ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Otto Pulz danke ich für die zahlreichen Ausflüge in die Welt der Mikroalgenbiotechnologie. Mein Dank gilt ebenfalls Frau Karin Loest, die mich für die Carotinoide begeistern konnte.

Ein besonderer Dank geht natürlich an die Arbeitsgruppe Biochemie, in der immer ein angenehmes Arbeitsklima herrschte, besonders erwähnt seien hier meine Kollegin Claudia Hecht, der ich für die zahlreichen Gespräche und die Bastel-AG danke, Frau Anja Pfeiffer, der mein Dank für die tatkräftige Unterstützung bei kontinuierlichen Kulturen gilt, sowie Frau Sigrid

Arnold als guter und gleichzeitig gestrenger Seele des Labors. Allen anderen Kollegen der Arbeitsgruppe und des Fachbereichs sei für die schöne Zeit in Köthen gedankt.

Den Studenten Claudia Böttcher und Sabine Streuber danke ich für die fleißige Mitarbeit an einigen Experimenten.

Meiner Familie möchte ich an dieser Stelle für die tatkräftige Unterstützung danken, ohne die mir diese Zeit sehr schwergefallen wäre. Danke Euch allen! Ein besonderer Dank gilt natürlich meinem Marko, der mich in turbulenten Zeiten immer unterstützt hat und nicht zuletzt eine große Hilfe beim Kampf mit den Formatierungen war.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Claudia Beate Grewe
Geburtstag: 21.05.1979
Geburtsort: Dresden
Wohnort: Mühlenbergstr. 54, 14513 Teltow
email: claudia.grewe@gmx.de
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: nichteheliche Lebensgemeinschaft, 1 Kind
(Helena Grewe, geb. 09.01.2005)

Ausbildung

09/1985 - 07/1990 Erweiterte Oberschule "Erich Weinert" in
Magdeburg
09/1990 - 07/1991 Erweiterte Oberschule "Reinhold Götze" in
Magdeburg
09/1991 - 07/1997 Gymnasium "Otto von Guericke" in Magdeburg
Abschluss: Abitur, Note: 1,4

Studium:

10/1997 - 02/2002 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Anhalt
(FH) in Köthen, Abschluss: Dipl.-Ing. (FH), Note: 1,2
05/ 2002 Auszeichnung der Diplomarbeit durch den Verein Deutscher
Ingenieure (VDI), Hallescher Bezirksverein
08/2004 - 2008 Promotion an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg,
Arbeitsgruppe Ökologische Pflanzen-Biochemie

Beruflicher Werdegang

03/2002 - 12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungsprojekt „Bio
technologischen Gewinnung von potenziellen Wirkstoffen aus
Mikroalgen“
05/2003 - 09/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Lehrfachgebiet Biochemie
(Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstech-
nik), Arbeitsgruppe Algenbiotechnologie an der HS Anhalt
(FH) in Köthen
seit 10/2007 Laborleiterin und wissenschaftliche Mitarbeiterin der Salata
GmbH
