

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

# **Reaktionstechnische Untersuchungen von Zulaufverfahren zur mikrobiellen Stoffproduktion im Parallelansatz**

**Christoph Bendig**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med., Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 29.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 30.01.2012 angenommen.



*Es ist nicht genug, zu wissen,  
man muß auch anwenden;  
es ist nicht genug, zu wollen,  
man muß auch tun.“*

*Johann Wolfgang von Goethe*

*(Werk: Wilhelm Meisters Wanderjahre)*

## Danksagung

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München durchgeführt. Während dieser Zeit, gab es immer wieder Momente der Freude und des Kummers, der Grenzerfahrungen und lehrreiche Momente. Die insgesamt gute und erfolgreiche Zeit möchte ich nicht missen und wird mich auf dem weiteren Weg mit Sicherheit prägen. Ich möchte allen danken, die mich in dieser Zeit begleitet haben und die in irgendeiner Weise einen Einfluss auf mich hatten. Einigen Personen möchte ich dabei besonders danken:

Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz möchte ich für das Vertrauen danken und die Möglichkeit die Arbeiten an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Zudem möchte ich mich bei ihm bedanken für die Dinge, die er mich als mein Doktorvater gelehrt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Brück möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats für meine Dissertation bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Wintermantel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes der Promotion.

Ein besonderer Dank gilt Andrea, die mich am Lehrstuhl eingewiesen hat und die mir ihr Wissen zum Riboflavinprozess zur Arbeit an den zugehörigen Geräten weitergegeben hat. Vielen Dank für die Ruhe und das Vertrauen bei der Arbeit. Im Rahmen des Riboflavinprojektes möchte ich mich weiterhin bei Dr. Michael Hans bedanken, der als Ansprechpartner von DSM Nutritional Products stets ein offenes Ohr hatte und mit mir offen über aktuelle Probleme in dem Projekt diskutiert hat.

Bei der Süd-Chemie AG und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung möchte ich mich für die Finanzierung im zweiten Teil meiner Dissertation bedanken.

Bei meinen Kollegen am Lehrstuhl möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre bedanken und für die Erfahrungen, die ich von euch gelernt habe. Besonders möchte ich dabei Peter für Diskussionen über das Projekt, Bernd für die Unterstützung bei den experimentellen Designs und die Informationen hierzu, Georg für das Lesen von Teilen meiner Arbeit und Martin für den Beistand bei der Erhaltung der Ordnung danken.

Den Festangestellten am Lehrstuhl möchte ich auch für die selbstverständliche Hilfe danken, die sie immer gewährt haben. Danke Irma für die Beantwortung von dummen und immer wiederkehrenden Fragen, Georg für die Unterstützung bei meinen Lieblingsprojekten, Norbert für das Wissen über immer neue Werkzeuge, die die Welt retten und Markus für die Weisheiten des Lebens.

Meinen Studenten Fei, Markus, Michael und Benjamin danke ich für die durchgeführten Arbeiten. Besonders danken möchte ich Jens, mit dem ich auf Augenhöhe diskutieren konnte und ohne den das letzte halbe Jahr mit Sicherheit nicht so erfolgreich verlaufen wäre.

Der btS und der Münchner GS für die Erfolge neben der Arbeit, die während gewisser Durststrecken die Motivation für die Laborarbeit geliefert haben.

Schließlich aber möchte ich nicht zuletzt meiner Familie, meinen Freunden und Steffi für die dauerhafte Unterstützung, Anteilnahme und das Zurückstecken, wenn die Arbeit mal wieder wichtiger war, danken.



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Problemstellung und Zielsetzung .....	3
3	Theoretische Grundlagen .....	7
3.1	Riboflavinherstellung mit <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
3.1.1	Riboflavin .....	7
3.1.2	Riboflavinproduzenten .....	8
3.2	Enzymherstellung mit filamentösen Pilzen .....	12
3.2.1	Hydrolytische Enzyme .....	12
3.2.2	Produzenten von Cellulasen und Hemicellulasen .....	18
3.3	Grundlagen der biotechnologischen Produktion .....	20
3.3.1	Kinetik des Wachstums .....	20
3.3.2	Prozessführung .....	23
3.4	Optimierung von Zulaufverfahren .....	30
3.4.1	Optimierung mit Versuchsplanungen .....	31
3.4.2	Modellbasierte Optimierung .....	33
4	Material und Methoden .....	36
4.1	Lösungen und Medien .....	36
4.1.1	Riboflavinproduktion .....	36
4.1.2	Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen .....	42
4.2	Mikrobiologische Methoden .....	46
4.2.1	Riboflavinproduktion .....	46
4.2.2	Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen .....	50
4.3	Analytische Methoden .....	54
4.3.1	Bestimmung der Zellkonzentration .....	54
4.3.2	Glukosemessung .....	56

---

4.3.3	Riboflavinmessung .....	57
4.3.4	Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen .....	57
4.3.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	58
4.3.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	58
4.4	Optimierung.....	62
4.4.1	Optimierung der Hemicellulaseproduktion.....	63
4.4.2	Optimierung der Cellulaseproduktion.....	63
5	Reaktionstechnische Untersuchungen der Riboflavinproduktion mit <i>Bacillus subtilis</i> RB50::[pRF69] <sub>n</sub> im Zulaufverfahren .....	65
5.1	Ammoniumkonzentration im Zulaufmedium.....	66
5.2	Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	68
6	Reaktionstechnische Untersuchungen zur Produktion von Hemicellulasen mit <i>Aspergillus aculeatus</i> DSM 2344 im Zulaufverfahren .....	76
6.1	Voruntersuchungen.....	77
6.2	Optimierung.....	79
6.2.1	Schätzung der Enzymaktivitäten.....	86
6.3	Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	94
6.4	Zusammenfassung .....	99
7	Reaktionstechnische Untersuchungen zur Cellulaseproduktion mit <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 im Zulaufverfahren .....	100
7.1	Voruntersuchungen.....	100
7.1.1	Einfluss des pH .....	101
7.1.2	Einfluss der Cellulosekonzentrationen.....	103
7.1.3	Reproduzierbarkeit in Schüttelkolben und Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab.....	104
7.1.4	Prozessvergleich zwischen Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab .....	107
7.2	Optimierung.....	109
7.2.1	Schätzung der Enzymaktivitäten.....	117
7.2.2	Validierung des identifizierten Modells.....	120
7.3	Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	125
7.4	Zusammenfassung .....	132

---

8	Zusammenfassung und Ausblick .....	134
8.1	Zusammenfassung .....	134
8.2	Ausblick.....	138
9	Literaturverzeichnis.....	139
10	Abkürzungs- und Variablenverzeichnis .....	150
10.1	Abkürzungen .....	150
10.2	Variablen .....	151
11	Abbildungsverzeichnis .....	153
12	Tabellenverzeichnis.....	157
13	Anhang .....	159
13.1	Verwendete Materialien und Geräte .....	159
13.2	Verwendete Chemikalien .....	161



## 1 Einleitung

Die Coca-Cola Company nutzt seit 2010 Bioethanol für die Produktion ihrer „PlantBottle®“ (The Coca-Cola Company, 2009). Damit stieg die Weltmarke in die Biotechnologie der Zukunft ein. Die Flasche wird zu 30 % aus Material hergestellt, das aus nachwachsenden Rohstoffen, nämlich aus brasilianischem Bioethanol produziert wird. Hierfür wird der Zucker des Zuckerrohrs zu Ethanol fermentiert und chemisch zu Monoethylenglykol umgewandelt. Dieses kann wiederum zur Produktion von Polyethylenglykol-(PET) Flaschen mit einer besseren CO<sub>2</sub>-Bilanz verwendet werden. Auch wenn die PlantBottle® in diesem Zusammenhang wahrscheinlich zum größten Teil eine Marketingaktion ist, stellt sie doch ein Beispiel für den derzeitigen Trend der Nutzung von nachhaltigen Ressourcen im Rahmen industrieller Biotechnologie und der grünen Chemie dar.

Neben dem allgemeinen Wachstum der Biotechnologie in Deutschland (Biotechnologie-Firmenumfrage 2011) wird in den nächsten Jahren vor allem das weltweite Potential der industriellen beziehungsweise weißen Biotechnologie von wirtschaftlicher Bedeutung sein. Für Chemieprodukte wird im Jahre 2020 ein Markt von über vier Billionen Dollar erwartet, von denen vermutlich mehr als 20 % der Produkte biotechnologisch hergestellt werden (Meyer und Werbitzky, 2011). Dies werden zum einen Feinchemikalien und chirale Moleküle sein, aber auch Massenprodukte wie Bernsteinsäure im Maßstab von mehreren tausend Tonnen pro Jahr (BASF, 2011). Die zunehmende „Biologisierung“ der chemischen Industrie hat im Wesentlichen zwei Gründe. Zum einen sind derzeit hergestellte biotechnologische Produkte aufgrund von geringeren Energiekosten und teilweise weniger Synthese- und Aufreinigungsschritten ökonomisch günstiger. Zum anderen lassen sich Produkte wie Enzyme als Katalysatoren oder einige chirale Moleküle nicht auf chemischem Wege produzieren. Auch rückt die Nutzung von alternativen Kohlenstoffquellen wie Lignocellulose oder CO<sub>2</sub> wegen der abnehmenden Vorräte an fossilen Quellen immer stärker in den Fokus der Chemieindustrie.

Damit die Biotechnologie den hohen Ansprüchen vor diesem Hintergrund genügen kann, gilt es, in den nächsten Jahren durch Forschung und Entwicklung umfassendes Wissen zu generieren. Dies umfasst die Modifikation und Kultivierung von neuen Mikroorganismen. Zudem ist es nötig, die Produktionskosten zu senken. Bei Bioethanol betrifft dies beispielsweise die Produktion von hydrolytischen Enzymen (Lynd et al., 2008), um Lignocellulose für die Ethanolgärung effizient verfügbar machen zu können. Die meisten Prozesse werden dabei im Litermaßstab entwickelt, wodurch die Parallelisierung auf Grund

des erhöhten Reaktions- und Personalaufwands begrenzt wird. Durch eine Maßstabsverkleinerung in den Milliliter- oder Mikrolitermaßstab lässt sich die Anzahl von parallelen Experimenten erhöhen. Die Optimierung von Produktionsprozessen kann beispielsweise durch die Nutzung von parallelen Milliliterrührkesselreaktoren beschleunigt werden (Vester, 2009b; Höfel et al., 2010).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Für die Herstellung biotechnologischer Produkte können im Wesentlichen drei Betriebsweisen der Prozessführung verwendet werden: das Satzverfahren, das Zulaufverfahren und der kontinuierliche Prozess. Das Satzverfahren stellt dabei die einfachste Prozessführung dar. Bei diesem werden alle für den Prozess benötigten Substrate im Bioreaktor vorgelegt und dieser mit dem Produktionsstamm inokuliert. Die Produktkonzentration am Ende des Prozesses ist dabei von der Substratkonzentration zu Prozessbeginn abhängig. Diese kann jedoch nicht beliebig groß gewählt werden, da hohe Konzentrationen an Substraten zu Inhibierungen und unerwünschten Nebenprodukten führen und dadurch die Produktivität der Mikroorganismen senken.

Durch die kontrollierte Zugabe von Substraten während der Prozesszeit werden im Zulaufverfahren diese Probleme umgangen. Dabei kann die Substratkonzentration im vorgelegten Satzmedium erniedrigt und anschließend auf einem gewünschten Niveau gehalten werden. Mit Hilfe dieser Kontrolle können Substratkonzentrationen eingestellt werden, bei denen der verwendete Organismus die höchste Produktbildung zeigt. Zudem lassen sich mikrobielle Umsetzungen verlängern und damit meist die Produktivität erhöhen (Sarkar und Modak, 2005). Die maximale Produktionszeit wird dabei durch nicht bekannte Limitierungen oder durch inhibierende Produkte im Reaktionsmedium bestimmt. Dieses Problem kann in einem kontinuierlichen Prozess durch die Zuführung von neuem Medium und das gleichzeitige Entfernen der gleichen Menge an Reaktionsmedium aus dem System behoben werden.

Bei der Prozessentwicklung und -optimierung hat die Prozessführung einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklungszeit. Können Satzverfahren in einfachen Schüttelkolben durchgeführt werden, so erhöht sich der apparative Aufwand bereits für Zulaufverfahren so weit, dass in der Regel Rührkesselreaktoren im Litermaßstab verwendet werden müssen. Aufgrund des erhöhten Aufwands lassen sich viele Experimente nur sequenziell durchführen. Eine Beschleunigung der Entwicklung von Zulaufverfahren ist daher von großem Interesse (Altenbach-Rehm et al., 1999). Bei gut charakterisierten Prozessen lassen sich dabei Optimierungen der Prozessführung mit Hilfe von Modellen durchführen (Park und Ramirez, 1988; Roubos et al., 1999). Meistens sind jedoch nicht alle Einflussgrößen bekannt und auf die Durchführung von experimentellen Untersuchungen kann nicht verzichtet werden. Hierfür bietet es sich an, die Prozesse in kleinere Maßstäbe (Milliliter- und Mikrolitermaßstäbe) zu überführen, die eine höhere Parallelisierbarkeit aufweisen (Bareither und Pollard, 2011;

Weuster-Botz et al., 2005). Die verwendeten Reaktoren müssen dabei für die reaktionstechnischen Untersuchungen geeignet sein und Ergebnisse liefern, die zumindest im Pilotmaßstab reproduzierbar sind. Für diese Fragestellungen wurden in den letzten Jahren verschiedene parallele Reaktorsysteme im Milliliter- und Mikrolitermaßstab entwickelt (Hortsch und Weuster-Botz, 2010b). Ein System aus 48 parallelen Rührkesselreaktoren im 10 mL-Maßstab wurde für die Kultivierung von Mikroorganismen entwickelt (Puskeiler et al., 2005a). Durch die Möglichkeit, pH und  $pO_2$  individuell online zu messen, konnte beispielsweise auch die Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* bereits im Zulaufprozess realisiert werden (Knorr et al., 2007). Dabei wurde die parallele Reproduzierbarkeit zwischen den eingesetzten Reaktoren und die Verwendung für den Vergleich verschiedener Stämme gezeigt (Knorr et al., 2007, Vester et al., 2009a). Für die Untersuchung von Zulaufmedien wurden die parallelen Rührkesselreaktoren bisher nicht eingesetzt. Diese Verwendung könnte die Entwicklung von Zulaufprozessen jedoch deutlich beschleunigen.

Ziel dieser Arbeit sollte daher sein, in den parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab reaktionstechnische Untersuchungen zur Entwicklung von Zulaufmedien durchzuführen. Aus den Vorarbeiten zur Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* war die Nutzung der parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab für komplexe Zulaufkultivierungen bereits etabliert (Knorr et al., 2007, Vester et al., 2009a). Durch eine Optimierung der Stickstoffquellen im Satzmedium konnte auch die Verwendbarkeit dieses Maßstabs für komplexe Fragen gezeigt werden (Vester, 2009b). Es soll nun als weitere Fragestellung die Stickstoffdosierung für diesen Prozess über das Zulaufmedium untersucht werden. Da die Zugabe des Zulaufmediums in die Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab nicht kontinuierlich sondern nur intermittierend erfolgen kann, sind weitere Experimente mit kontinuierlichem Zulauf im Rührkesselreaktor im Litermaßstab notwendig.

Neben der Kultivierung von Bakterien und Hefen in parallelen Rührkesselreaktoren (Höfel et al., 2010; Gebhardt, 2010) konnte mit Hilfe eines weiteren Rührorgans (Paddelrührer) die Nutzung der Parallelreaktoren für das mycelbildende Bakterium *Streptomyces tendae* gezeigt werden (Hortsch et al., 2010a). Dieses Rührorgan soll nun erstmals für die Produktion von Cellulasen und Hemicellulasen mit den filamentösen Pilzen *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 und *Trichoderma reesei* RUT-C30 verwendet werden. Dabei ist zuerst die Reproduzierbarkeit des Wachstums und der Produktion zu untersuchen. Im Weiteren soll für *A. aculeatus* DSM 2344 die Entwicklung eines Zulaufmediums in den parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab durchgeführt werden.

Die Produktion von Cellulasen muss aufgrund der Anwendung für die Zersetzung von Lignocellulose und die anschließende Umsetzung der so gewonnenen Zucker zu Massenprodukten möglichst günstig sein (Lynd et al., 2008). Günstige Kohlenstoffquellen, wie Lignocellulose und andere Feststoffe sind daher für diese Prozesse von Interesse (Marten et al., 1996; Serrano-Ruiz et al., 2010). Für *T. reesei* RUT-C30 soll deshalb neben Untersuchungen zum Zulaufmedium die Verwendung von mikrokristalliner Cellulose als Substrat im Satzmedium betrachtet werden. Der Abbau der Cellulose durch die während des

Prozesses produzierten Cellulasen gibt dabei die Substratverfügbarkeit und damit auch die Wachstumsrate vor (Esterbauer et al., 1991). Eine Zugabe des Zulaufmediums kann daher in größeren Abständen geschehen, als in Prozessen ohne Feststoffsubstrat. Dies ermöglicht die Durchführung eines Zulaufprozesses im Schüttelkolben, der mit den Ergebnissen aus den Rührkesselreaktoren, sowohl im Milliliter- als auch im Litermaßstab verglichen werden soll.

Eine mögliche Zeitersparnis bei der Entwicklung von Zulaufprozessen durch die Verwendung von parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Hierfür wurden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

- Untersuchungen zur Stickstoffzufuhr über das Zulaufmedium für die Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* RB::[pRF69]<sub>n</sub>
  - Mit intermittierendem Zulauf in parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab
  - Mit kontinuierlichem Zulauf im Rührkesselreaktor im Litermaßstab
- Untersuchungen zur Produktion von Hemicellulasen mit *Aspergillus aculeatus* DSM2344
  - Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Produktion in parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab
  - Entwicklung eines Zulaufmediums im Parallelansatz
  - Reaktionstechnische Untersuchungen der gewonnenen Ergebnisse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab
- Untersuchungen zur Produktion von Cellulasen mit *Trichoderma reesei* RUT-C30
  - Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Produktion in parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab
  - Untersuchungen zur Verwendbarkeit von Feststoffsubstraten und Entwicklung eines Zulaufmediums im Parallelansatz, sowohl in Schüttelkolben als auch in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab
  - Reaktionstechnische Untersuchungen der gewonnenen Ergebnisse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab



## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Riboflavinherstellung mit *Bacillus subtilis*

Das erfolgreiche Ersetzen eines chemischen Produktionsprozesses durch ein biotechnologisches Verfahren ist anhand der Produktion von Riboflavin (Vitamin B2) erfolgreich demonstriert worden. Neben einer erhöhten Ausbeute konnte die Nebenproduktbildung verringert und der Energieverbrauch um 25 % gesenkt werden (van Loon et al., 1996). Das biotechnologisch produzierte Riboflavin wies zudem weniger Verunreinigungen auf als das chemisch synthetisierte und es konnte keine DNA der Produktionsorganismen im finalen Produkt nachgewiesen werden (Bretzel et al., 1999).

#### 3.1.1 Riboflavin

Riboflavin wird auch als Vitamin B2 bezeichnet und zeigt eine gelbe Farbe. Der Name setzt sich aus der Verknüpfung aus einem Ribityl- und einem Flavinrest zusammen. Es ist ein wichtiger Bestandteil des Stoffwechsels, da es eine Vorstufe des Flavinmononucleotids (FMN) und des Flavin-Adenin-Dinucleotids (FAD) darstellt. Diese beiden Co-Enzyme fungieren in vielen im Stoffwechsel aktiven Oxidoreduktasen als Redox-System und zählen daher zu den wichtigen biologischen Elektronenakzeptoren und -donoren (Möseneder, 2011). Riboflavin ist ein schlecht wasserlösliches Molekül, das sehr lichtempfindlich ist, aber gegenüber höheren Temperaturen – also auch beim Kochen – stabil bleibt. Hierdurch kann der tägliche menschliche Bedarf von bis zu 1,4 mg d<sup>-1</sup> (EU-RDA, Richtlinie 2008/100/EG) in der Regel durch die Nahrungsaufnahme abgedeckt werden, wenn ausreichend Milch-, Fisch- und Fleischprodukte verzehrt werden (Souci et al., 2005). Heute sind viele Nahrungsmittel mit Vitamin B2 angereichert. Zum einen, um eine Aufwertung des Produkts zu erreichen, zum anderen um durch die gelbliche Farbe des Vitamins eine Gelbfärbung zum Beispiel von Milchprodukten wie Käse zu erreichen (Brachnik und Vreden, 2007). Eine Überdosierung von Riboflavin ist aufgrund der geringen Toxizität und des leichten Ausscheidens über den Urin nicht möglich (Möseneder, 2011).

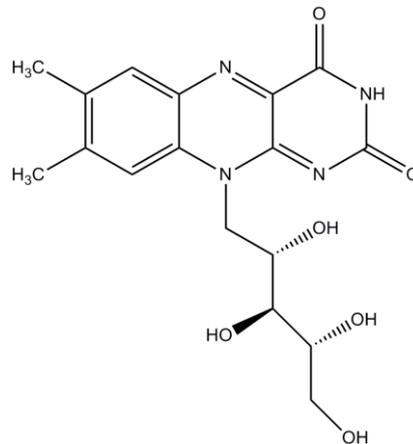


Abbildung 3.1: Chemische Struktur des Riboflavinmoleküls

### 3.1.2 Riboflavinproduzenten

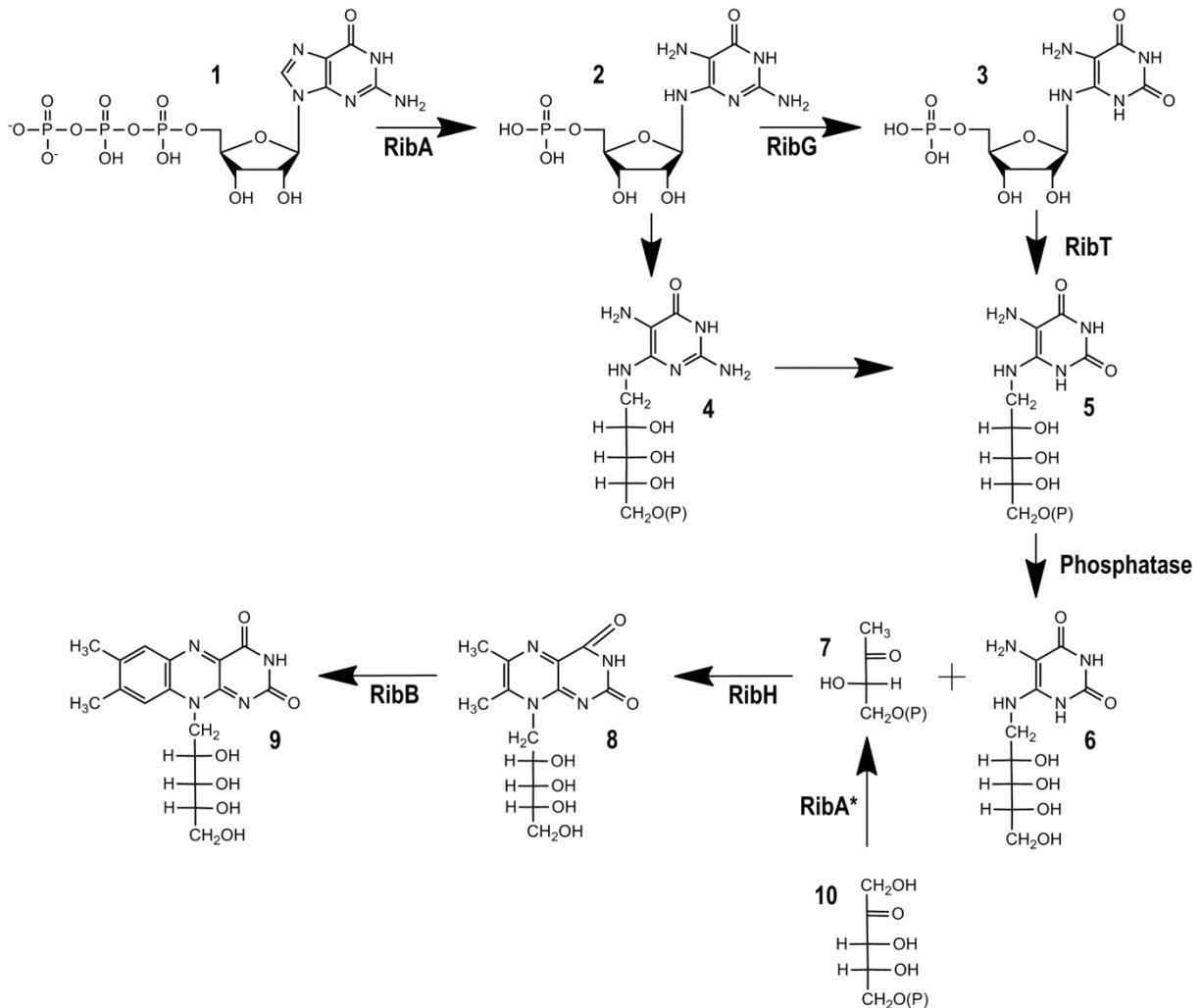
Die chemische Produktion von Riboflavin wurde um das Jahr 2000 bei den größten Riboflavinproduzenten BASF, DSM Nutritional Products (damals noch Hoffman-La Roche) und ADM (Archer Daniels Midland Company) nahezu eingestellt. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle drei Firmen einen biotechnologischen Produktionsprozess, der jedoch jeweils auf unterschiedlichen Organismen beruhte. BASF nutzt den Pilz *Ashbya gossypii*, DSM das Bakterium *Bacillus subtilis* und ADM die Hefe *Candida famata* (Stahmann et al. 2000). *A. gossypii* und *C. famata* stellen natürliche Riboflavin-Überproduzenten dar. Das bedeutet, dass bereits die Wildtypen dieser Stämme mehr Riboflavin produzieren, als sie für ihren Stoffwechsel benötigen, und dieses entsprechend ausscheiden. Mit dieser für die Zellen auf den ersten Blick unökonomischen Verhaltensweise schützen sie ihre Sporen durch das Riboflavin vor UV-Licht (Stahmann et al., 2001). Zur Steigerung der Effizienz wurden alle Produktionsorganismen genetisch modifiziert, so dass Produktkonzentrationen von 14 bis 20 g L<sup>-1</sup> möglich wurden (Bigelis et al. 1989, Heefner et al., 1994 und Perkins et al., 1999).

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Bacillus subtilis* stellt keinen natürlichen Riboflavin-Überproduzenten dar, ist aber ein in der biotechnologischen Produktion weit verbreiteter Organismus. *Bacillus subtilis* ist ein grampositives Bakterium, welches eine peritrich-begeißelte Stäbchenform aufweist. Es gehört zur Klasse der Bazillen und ist aufgrund der phylogenetischen Nähe zu einigen Pathogenen von besonderer Bedeutung in der klinischen Forschung. *B. subtilis* wächst bevorzugt aerob, kann sich aber durch Nitratatmung und Gärung auch unter anaeroben Bedingungen vermehren. Es lässt sich besonders leicht aus Heu isolieren und trägt daher den Beinamen „Heubacillus“. Als ubiquitäres Bakterium ist es sowohl in der Luft als auch in Wasser und Erde zu finden. Dabei sind die oberen Schichten des Erdbodens der bevorzugte Lebensraum. In diesen Bodenschichten kommt es häufig zu Temperaturschwankungen sowie Schwankungen des pH, des osmotischen Drucks und der verfügbaren Nährstoffe. Unter zu widrigen Bedingungen können die Stämme Sporen bilden,

die sehr resistent gegen extreme Temperaturen und Trockenheit sind. *B. subtilis*-Stämme produzieren neben extrazellulären hydrolytischen Enzymen zur Gewinnung von Nährstoffen auch Antibiotika, die bei der Sicherung der ökologischen Nische helfen (Stein, 2005).

In der Biotechnologie ist *Bacillus subtilis* neben *Escherichia coli* der am weitesten verbreitete Mikroorganismus. Dies ist zum einen auf die natürliche Fähigkeit zur DNA-Aufnahme zurückzuführen, die eine genetische Manipulation erleichtert. Auf diese Weise konnte *B. subtilis* umfangreich genetisch und molekularbiologisch untersucht und in den letzten Jahren auch sequenziert werden. Zum anderen besitzt *B. subtilis* für einige Produkte den Status eines GRAS (generally recognized as safe)-Organismus, wodurch es besonders in der Produktion für Lebensmittel und Pharmazeutika einen großen Vorteil gegenüber *E. coli* aufweist. Westers et al. (2004) beschreiben, dass 60 % der kommerziell erhältlichen Enzyme mit *B. subtilis*-Stämmen hergestellt werden, da sie diese häufig bereits als homologe Proteine besitzen und daher leichter für die Überproduktion optimierbar sind. Unter diesen meist sekretierten Proteinen sind vor allem hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Xylanasen zu finden, die in der Waschmittel-, Stärke- und Lebensmittelindustrie genutzt werden.

In der Produktion von Riboflavin wurde *Bacillus* bereits eingesetzt, bevor das gesamte Produkt damit hergestellt werden konnte. In der chemischen Produktion wurde die eingesetzte Ribose als Vorstufe des Riboflavins größtenteils bereits biotechnologisch mit einem *B. pulilllis*-Stamm hergestellt (Bretzel et al., 1999). Die vollständige Biosynthese von Riboflavin ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Vorstufen für die Produktion des Riboflavins stammen dabei aus dem Pentosephosphatweg. Bei der Synthese werden stöchiometrisch ein Molekül Guanosine-Triphosphat (GTP) und zwei Moleküle Ribose-5'-Phosphat umgesetzt, um das Riboflavin über mehrere Stufen aufzubauen (Bacher et al., 2000, Abbildung 3.2): Zu Beginn der Synthese wird der Imidazolring des GTP durch die GTP-Cyclohydrolase II unter Freisetzung eines Moleküls Methansäure geöffnet und gleichzeitig ein Diphosphat von dem Phosphatresten abgespalten (Molekül 1 zu 2). Im Weiteren wird eine Aminogruppe des heterolytischen Rings abgespalten und der Ribosering durch eine Reduktion geöffnet (Molekül 2 zu 5). Die Reihenfolge dieser beiden Schritte hängt vom Organismus ab, wobei bei Bakterien die Abspaltung der Aminogruppe zuerst geschieht. Nach der Dephosphorylierung des entstandenen Moleküls zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion (6) wird an dieses durch die 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine-Synthase ein Teil eines Ribose-5'-Phosphats kondensiert (7), von dem zuvor ein Molekül Methansäure abgespalten wird. Die Ribose wird dabei direkt aus dem Pentosephosphatweg entnommen. Das entstehende 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL, 8) ist eine Vorstufe des Riboflavins und wird durch Disproportionierung zu Riboflavin (9) und 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion (6), welches wieder in die Riboflavinsynthese eingeht.

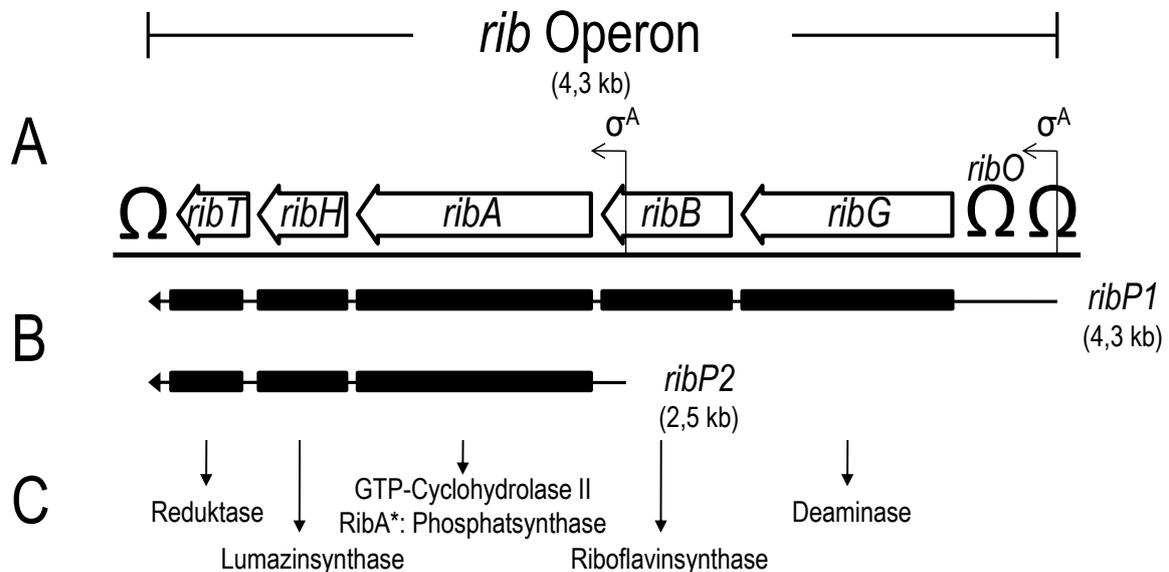


**Abbildung 3.2: Riboflavinbiosynthese (nach Bacher et al., 2000; Perkins und Pero, 1993)**

Substrate und Zwischenprodukte der Riboflavinbiosynthese in Bakterien und Eukaryoten: (1) Guanosintriphosphat (GTP), (2) 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidin-5'-Phosphat, (3) Zwischenstufe bei Bakterien, (4) Zwischenstufe bei Eukaryoten, (5) 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat, (6) 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion, (7) 3,4-Dihydroxybutanon 4-Phosphat, (8) 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL), (9) Riboflavin, (10) Ribulose-5-phosphat. Neben den chemischen Formeln sind die Enzyme für die einzelnen Katalyseschritte dargestellt: RibA: GTP-Cyclohydrolase II, RibG: Riboflavin-Deaminase, RibT: Reduktase, RibA\*: 3,4-Dihydroxy-2-Butanon 4-Phosphatsynthase, RibH: Lumazinsynthese, RibB: Riboflavinsynthase.

Für die Produktion von Riboflavin mit *Bacillus subtilis* musste zuerst ein entsprechender Stamm entwickelt werden, da es keine bekannten Überproduzenten gab. Dies erfolgte in einer Kombination aus klassischen Mutationen und gentechnischen Modifikationen. Für die Synthese von Riboflavin aus GTP und Ribulose-5'-Phosphat benötigt *Bacillus* fünf Genprodukte. Die Gene *ribA*, *ribB*, *ribG*, *ribH* und *ribT* sind bei *B. subtilis* alle in einem Operon organisiert, das durch die regulatorische Sequenz *ribO* kontrolliert wird (Abbildung 3.3, Perkins und Pero, 1993). Dabei codiert *ribA* für die GTP-Cyclohydrolase II, die den ersten Schritt der Biosynthese katalysiert sowie die 3,4-Dihydroxy-2-Butanon 4-Phosphatsynthase, die die Spaltung des Ribulose-5-Phosphats durchführt. Über eine Deaminase und eine Reduktase als Genprodukt von *ribG* und *ribT* und eine Lumazinsynthese,

aus dem Gen *ribH*, geschieht die weitere Synthese zu DMRL. Im letzten Schritt katalysiert die Riboflavinsynthase aus *ribB* die Biosynthese zu Riboflavin (Perkins und Pero, 1993).



**Abbildung 3.3: *rib*-Operon in *B. subtilis* (nach Perkins und Pero, 1993)**

Die Struktur des *rib*-Operons aus *B. subtilis* zeigt (A) die vier Gene *ribG*, *ribB*, *ribA* und *ribH*, die für die Riboflavinsynthese benötigt werden, und die zugehörigen regulatorischen Elemente. Das Operon wird durch die regulatorische Sequenz *ribO* und die Transkriptionsterminations Regionen  $\Omega$  kontrolliert.  $\sigma^A$  stellt die beiden Promotorregionen dar, die bis zur Terminationsregion laufen. Dadurch können (B) zwei verschiedene Transkripte *ribP1* und *ribP2* erstellt werden, eins mit fünf und eins mit drei Genen. (C) Aus den Transkripten werden die für die Riboflavinsynthese benötigten Enzyme synthetisiert.

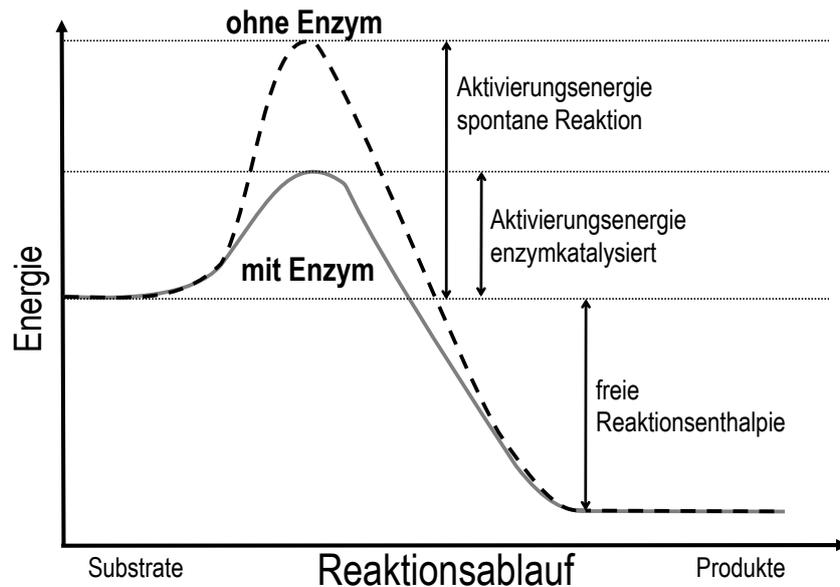
Die Entwicklung des Produktionsstammes lief über sechs Generationen bis zum verwendeten Grundstamm. In diesen Stamm wurden anschließend weitere Plasmide mit den *rib*-Genen integriert (Perkins et al., 1999): Ausgehend von dem Wildtyp *B. subtilis* 168 wurden mittels Ethylmethansulfonat (EMS) Stämme mutiert, die eine Resistenz gegen die Purinanaloga 8-Azaguanine (Az) und Decoyinine (Dc) aufzeigten ( $Az^r$  und  $Dc^r$ ) und dadurch einen erhöhten Kohlenstofffluss durch den Pentosephosphatweg zu GTP zeigten. Die mutierten Gene in der Purinsynthese wurden in einen *B. subtilis* 1A383-Stamm transformiert, um weitere durch Ethylmethansulfonat ausgelöste Mutationen nicht mit in den finalen Stamm zu nehmen. Ein weiterer Vorteil dieses Stammes war eine Mutation in dem Gen *purA60*, das für die Adenylsuccinatsynthetase codiert. Diese wandelt wiederum Inosine-5'-monophosphat (IMP), welches eine Zwischenstufe in der Synthese von Ribulose-5'-Phosphat zu GTP ist, zu Adenosinmonophosphat (AMP) um. Durch die Mutation in *purA60* kommt es zu einer Verstärkung des Flusses in Richtung GTP und eine Verringerung der AMP-Synthese. Da der resultierende Stamm weiterhin die Eigenschaft Sporen auszubilden verloren hat, wird die Arbeit im Labor erleichtert, da eine Vermehrung und Kontamination von anderen Stämmen reduziert wird. Weiterhin wurde eine Resistenz gegen Methioninsulfoxid entdeckt, die einen Abbau von IMP zu Inosin verhindert und dadurch den Stofffluss zu GTP weiter erhöht. In einem letzten Schritt der klassischen Mutation wurde durch UV-induzierte Mutagenese eine Variante erstellt, die gegen das Riboflavinanalogon, Roseoflavin, resistent ist ( $RoF^r$ ) und

*B. subtilis* RB50 genannt wurde. Zusätzlich wurde im Gen *ribC* der Riboflavinkinase (RibC) eine Mutation gefunden. Die Riboflavinkinase katalysiert die Umformung von Riboflavin zu FMN. Weiterhin wird vermutet, dass RibC eine regulatorische Funktion auf das *rib*-Operon besitzt (Karelov et al., 2011). Diese Mutante produzierte mit einer Konzentration von  $40 \text{ mg L}^{-1}$  fast sechsmal so viel Riboflavin im Schüttelkolben wie Klone aus dessen Elterngeneration. Der so entwickelte Stamm wurde dann mit dem Plasmid pRF69 transformiert, welches kein Bacillus-Replikon aber eine Chloramphenicolresistenz enthielt. Hierdurch konnte gewährt werden, dass Mutanten, die eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum zeigten, das Plasmid ins Genom integriert haben mussten. Neben diesen beiden Merkmalen enthielt das Plasmid ein Riboflavinoperon mit zwei  $P_{15}$ -Promotoren aus dem *Bacillus*-Phagen SPO1, die genaufwärts von *ribG* und *ribA* integriert wurden. Der so entwickelte Stamm *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> konnte im Zulaufverfahren in einem Rührkesselreaktor  $14 \text{ g L}^{-1}$  Riboflavin produzieren und wurde in dieser Arbeit verwendet. Durch ein weiteres Plasmid mit den Promotoren an anderen Stellen des Operons konnte der Stamm *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub>::[pRF93]<sub>m</sub> erstellt werden, der signifikant höhere Produktkonzentrationen als der Elternstamm ohne das Plasmid pRF93 erzielte (Perkins et al., 1999).

## 3.2 Enzymherstellung mit filamentösen Pilzen

### 3.2.1 Hydrolytische Enzyme

Enzyme sind Proteine mit einer katalytischen Aktivität. Sie bestehen aus einzelnen Aminosäuren, die durch ihre Verknüpfung eine dreidimensionale Tertiärstruktur bilden. In dieser Struktur bilden sich bei Enzymen meistens Taschen und Bindungselemente, die für die katalytische Aktivität zuständig sind. Die Substrate werden durch Bindung an diese Untereinheiten des Enzyms in einen für die Reaktion bevorzugten Übergangszustand versetzt, was die Reaktion erleichtert. Das Produkt aus der Reaktion bindet mit geringerer Affinität an das aktive Zentrum, dissoziiert aus dem Enzym und gibt die Tasche wieder frei. Dabei agieren Enzyme wie chemische Katalysatoren, in dem sie Reaktionen beschleunigen, das Gleichgewicht der Reaktion jedoch nicht verschieben können (Aehle, 2004; Uhlig, 1991). Bei der Reaktion gehen je nach Art der Reaktion ein oder mehrere Moleküle in einen Zustand mit geringerer freier Enthalpie über (Abbildung 3.4). Das Erreichen dieses neuen Zustands erfolgt über einen energetisch höheren Zwischenzustand. Um diesen Zustand zu überwinden, muss zunächst Aktivierungsenergie in die Reaktion eingebracht werden (Uhlig, 1991).



**Abbildung 3.4: Energiediagramm einer enzymatischen Reaktion (nach Uhlig, 1991)**

Der Ablauf einer Reaktion zu einem Zustand mit einer niedrigeren freien Enthalpie erfolgt über einen Zwischenzustand. Dieser ist gegenüber dem Ausgangszustand energiereicher und muss zum Ablauf der Reaktion aufgebracht werden. Durch das Enzym wird die benötigte Aktivierungsenergie verringert und die benötigte Energie reduziert.

Durch den Einsatz eines Katalysators – in diesem Fall eines Enzyms – wird diese Aktivierungsenergie verringert und das Molekül kann erleichtert in den neuen Zustand umgesetzt werden (Chmiel, 2006). Viele Enzymreaktionen können dabei durch eine Sättigungskinetik (Michaelis und Menten, 1913) beschrieben werden. Diese geht davon aus, dass eine Enzymreaktion aus zwei kinetischen Schritten besteht. Der eine beschreibt dabei die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ( $ES$ ), der zweite die katalytische Reaktion (Gleichung 3.1). Der Enzym-Substrat-Komplex kann sich jedoch wieder auflösen ohne dass eine Reaktion stattfindet und wird deshalb mit einer Hin- ( $k_1$ ) und Rückreaktion ( $-k_1$ ) beschrieben. Die Reaktion des Substrats ( $S$ ) zum Produkt ( $P$ ) und dem freigesetzten Enzym ( $E$ ) wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{cat}$  beschrieben.



Für die Erstellung der Sättigungskinetik der beschriebenen Reaktion müssen die folgenden Annahmen gemacht werden.

1. Es reagiert jeweils nur ein Enzym mit einem Substratmolekül, wodurch die Enzymkonzentration sich aus den Konzentrationen des frei vorliegenden Enzyms  $[E]$  und dem Enzym-Substrat-Komplex  $[ES]$  zusammensetzt.
2.  $[ES]$  ändert sich auf Grund eines Fließgleichgewichts (steady-state-Annahme) des Komplexes nicht, da Bildung und Verbrauch gleich sind:  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$
3. Die Reaktion  $k_{cat}$  stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar
4. Es gibt keine Rückreaktion des Produktes zum Enzym-Substrat-Komplex ( $ES$ ), also kein  $-k_{cat}$ , da die Reaktion nicht im thermodynamischen Gleichgewicht ist

Aus der Massenbilanz von  $[ES]$  und der Annahme des Fließgleichgewichts lässt sich die Sättigungskonstante  $K_M$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  oder  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) aus den Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten:

$$K_M = \frac{k_{-1} \cdot k_{cat}}{k_1} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Durch das Fließgleichgewicht lässt sich weiterhin die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  also die Änderung der Produktkonzentration  $[P]$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $[S]$ , der Sättigungskonstante  $K_M$  und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  (in  $\text{s}^{-1}$  oder  $\text{min}^{-1}$ ) erstellen (Gleichung 3.3). Dabei wird  $v_{max}$  aus der Enzymkonzentration zu Beginn der Reaktion  $[ES]_0$  und  $k_{cat}$  gebildet.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

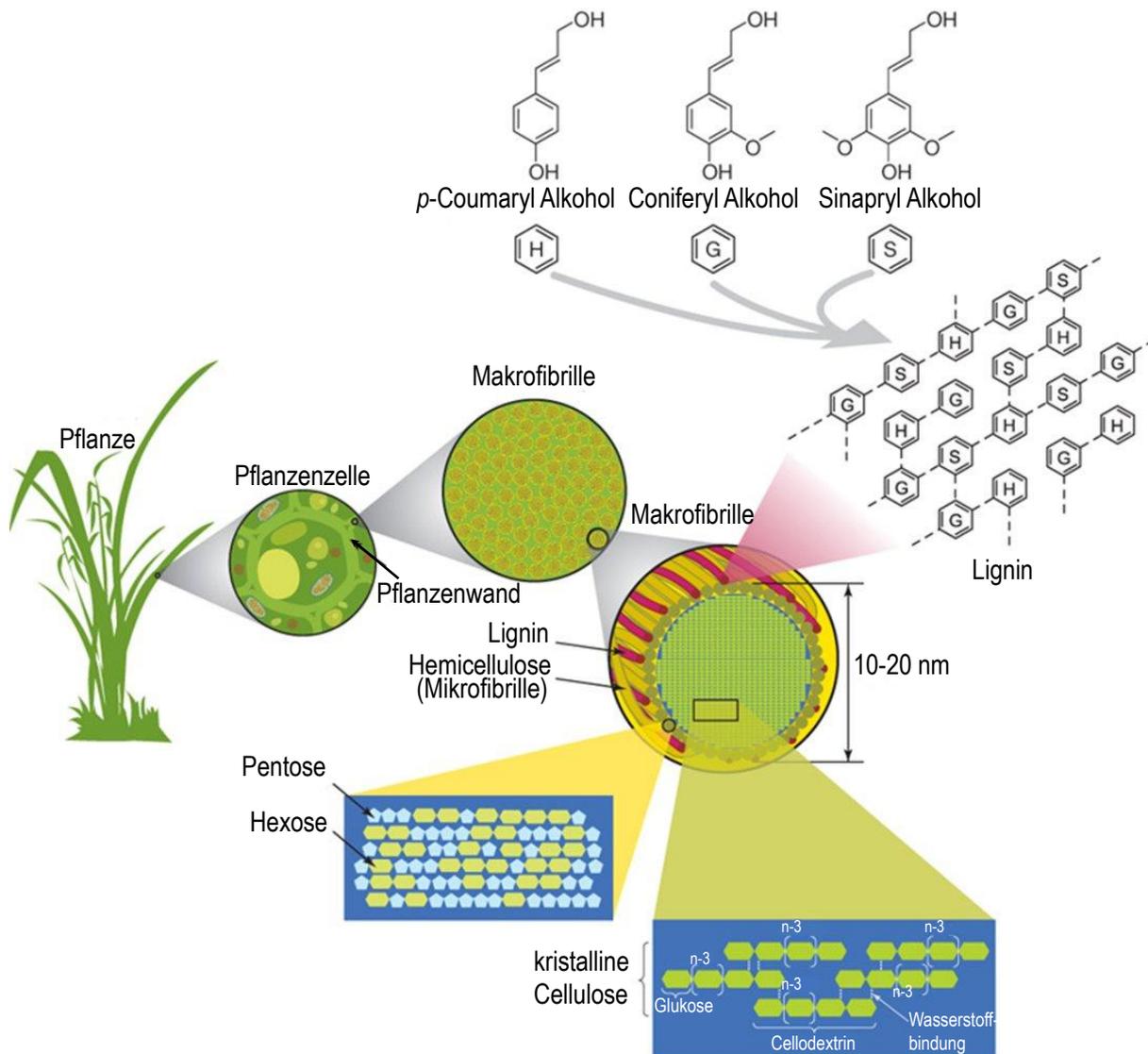
Die Sättigungskonstante gibt dabei die Substratmenge an, bei der das Enzym mit der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $0,5 \cdot v$ ) arbeitet. Die beiden kinetischen Modellparameter helfen, Enzyme mit einfachen Reaktionen zu beschreiben und zu charakterisieren (Aehle, 2004; Chmiel, 2006).

Für hydrolytische Enzyme, die in die „Enzyme Commission“ (EC)-Klasse 3 eingeordnet werden, lässt sich in vielen Fällen die Sättigungskinetik verwenden, solange es sich um lösliche Substrate handelt. Dabei arbeiten die Enzyme durch die hydrolytische Spaltung von Substraten nach Gleichung 3.4, bei der chemische Gruppen immer auf ein Wassermolekül übertragen werden (Smith, 1995).



Je nach Art der Bindung, an der sie angreifen, werden die Enzyme in weitere Unterklassen eingeteilt. Neben Enzymen, die an Esterbindungen, Etherbindungen und Peptidbindungen angreifen, stellt die Unterklasse 2 der Hydrolasen, die an Glykosidbindungen spalten, eine große Gruppe der hydrolytischen Enzyme dar. Diese Glykosidasen existieren für alle Arten der Polysaccharide und sind meist spezifisch zu bestimmten Zuckerarten. So bauen die Amylasen die langkettige Stärke zu Glukose ab, die Invertasen und Maltasen spalten Disaccharide in die einzelnen Zuckerbestandteile, wobei all diese Enzyme  $\alpha$ -Glykosidverbindungen spalten. Die alpha-Verbindungen kommen in Pflanzen und Tieren vor allem zur Speicherung von Zuckern in Form von Stärke beziehungsweise Glykogen vor und müssen aus dieser Funktion heraus leicht abbaubar sein (Uhlig, 1991). Anders sieht es bei den  $\beta(1-4)$ -Verbindungen von Glukose aus, die zu langen linearen Ketten führen und damit die Cellulose bilden. Dieses Polysaccharid ist für die Struktur der Zellen in Pflanzen zuständig und gibt diesen ihre Zugfestigkeit gegenüber mechanischen Beanspruchungen. Die Cellulose ist eine der stabilsten Verbindungen der Erde, da sie eine Halbwertszeit von rund 5 Millionen Jahren aufweist (Wolfenden und Snider, 2009). Die Cellulasen, die diese in wenigen Minuten abbauen können, gehören auf Grund der enormen Beschleunigung des Abbaus zu den effektivsten bekannten Enzymen. Die kinetische Beschreibung dieser

Enzymklasse ist schwierig, da das Substrat in der Regel in unlöslicher Form vorliegt. Hierdurch würde sich eine Mischung aus einer Kinetik für homologe Reaktionen und der Langmuir-Hinshelwood-Kinetik für heterogene Katalyse ergeben, wie Bansal et al. (2009) zusammenfassen. Weiterhin wurde von den Autoren auf den Mangel eines Modells hingewiesen, welches alle Einflüsse des enzymatischen Abbaus der Cellulose einbezieht. Dabei muss für die Cellulasen in der Regel das Substrat zunächst näher definiert werden, da es in der Natur meist nicht als homogene Cellulose sondern als heterogene Lignocellulose vorliegt (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Lignocellulose und deren Bestandteile (aus Rubin, 2008)**

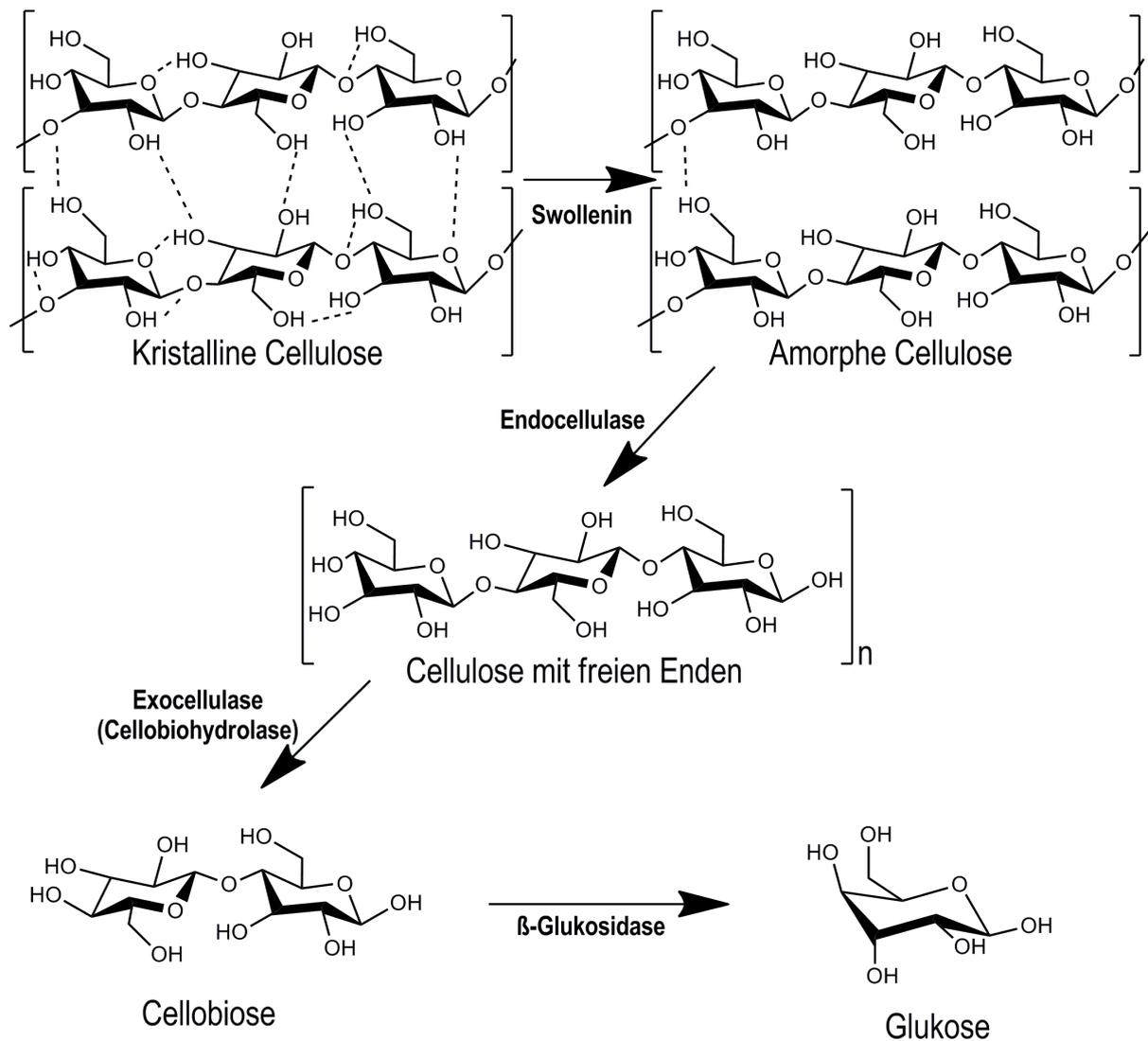
Dargestellt ist der Pflanaufbau mit den Pflanzenzellen, deren Zellwänden und den Makro- und Mikrofibrillen. Die Mikrofibrillen setzen sich aus Cellulosesträngen, die aus  $\beta(1-4)$ -glykosidisch verbundenen Glukosemolekülen bestehen, mit kristallinen und amorphen Bereichen zusammen. Zudem setzt sich die Hemicellulose aus Ligninsträngen und dem Xylan zusammen.

Lignocellulose setzt sich im Wesentlichen aus drei Polymeren zusammen. Zum einen ist dies mit rund 40 % die Cellulose, die damit die häufigste organische Verbindung der Welt ist. Als  $\beta(1-4)$ -glykosidisch verknüpfte lineare Glukosekette verleiht die Cellulose den Pflanzen die Zugfestigkeit. Dabei bilden die linear aufgebauten Celluloseketten Mikrofibrillen, die durch

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen wiederum in ihrer Kristallinität variieren. Die Mikrofibrillen bilden zusammen mit den Ligninketten (ca. 20-30 %) und der Hemicellulose (ca. 20-30 %) die Makrofibrillen, die in den Zellwänden für Stabilität sorgen (Rubin, 2008; Sjöström, 1993). Lignin ist ein amorphes Netzwerk aus Phenylpropanoiden, die verschiedene Seitenketten besitzen können. Dieses verleiht der Pflanze wiederum ihre Druckfestigkeit und sorgt für die Verholzung. Die Hemicellulose und deren größter Anteil, das Xylan, ist der dritte Bestandteil der Makrofibrillen und fungiert als eine Füllmasse (Saha, 2003). In dieser Funktion ist Xylan wichtig für die Verknüpfung der Cellulose- und Ligninstränge. Xylan, das zweithäufigste Polysaccharid der Welt (Polizeli, 2005), besteht aus einer Kette aus  $\beta(1-4)$ -glykosidisch verknüpften Xylosemolekülen, an die meist monomere Zucker und weitere kleine Gruppen wie Acetylgruppen als Seitenketten gebunden sind. Arabinofuranose und Xylopyranose sind dabei die häufigsten Zucker, die an die Hauptkette gebunden sind. Die Menge und die Art der Seitengruppen variiert stark zwischen den einzelnen Pflanzenarten. Auch der Anteil der drei Bestandteile der Lignocellulose variiert zwischen ihnen und ist zudem abhängig von den Wachstumsbedingungen wie der Bodenbeschaffenheit und der Feuchtigkeit (Saha, 2003).

Für den enzymatischen Abbau der Lignocellulose sind wegen ihrer Komplexität im Aufbau und der verschiedenen verbauten Zucker eine Vielzahl an Enzymen nötig. Dabei stellen der komplexe Aufbau und die hierdurch entstehende sterische Hinderung der Enzyme ein weiteres Problem in der gezielten Zerlegung von Lignocellulose dar. Die zur Zersetzung benötigten Enzyme werden in den natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaften von unterschiedlichsten Mikroorganismen produziert. Diese Enzyme und deren Mengenanteile unterscheiden sich bei den verschiedenen Organismen. Bei der Verwendung von Cellulasen und Hemicellulasen in der technischen Zersetzung von Lignocellulosen werden in der Regel Enzyme aus Pilzen verwendet.

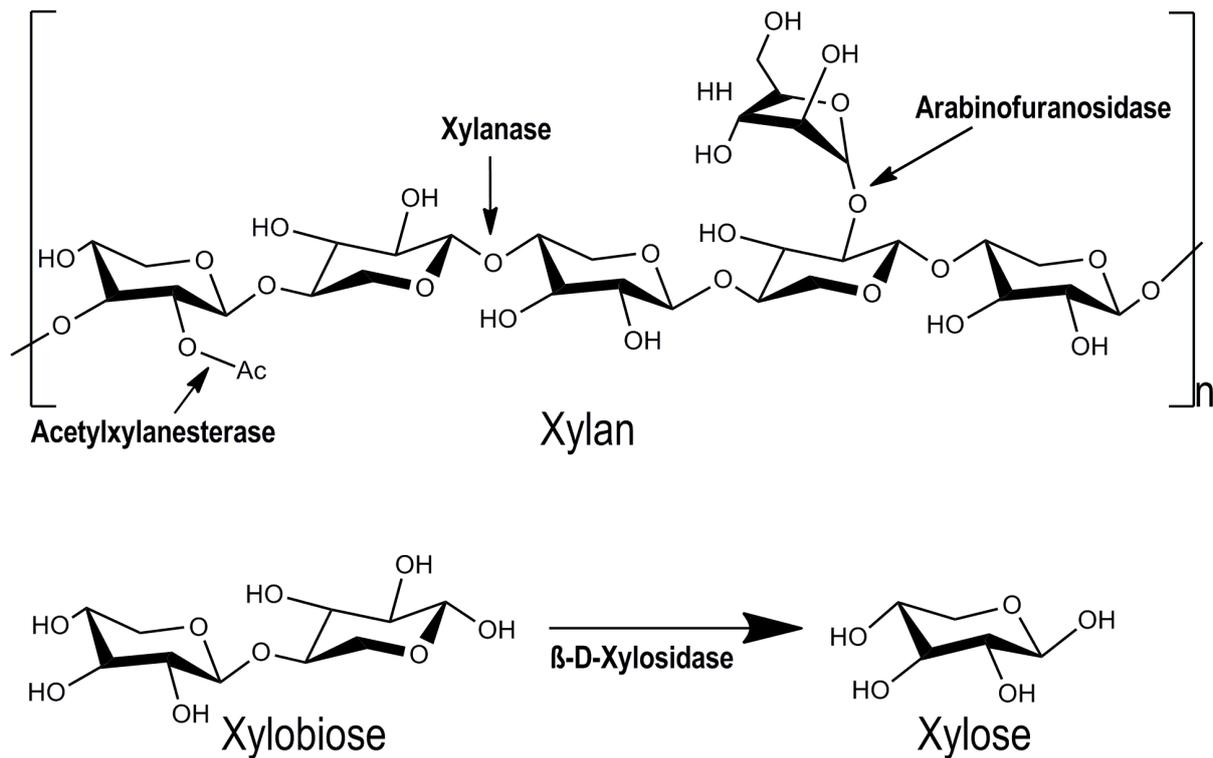
Am Celluloseabbau sind im Wesentlichen drei Enzymklassen beteiligt, die in ihrer Gesamtheit als Cellulasen bezeichnet werden. In Abbildung 3.6 sind die Endocellulasen (EC 3.2.1.4), die Exocellulasen (Cellobiohydrolasen, EC 3.2.1.91) und die  $\beta$ -Glukosidasen (Cellobiasen, EC 3.2.1.21) dargestellt. Die Endocellulasen greifen an amorphen, nicht kristallisierten Bereichen der Cellulose an. Durch die intramolekularen Spaltungen in der Mitte der Cellulosestränge entstehen freie Zuckerenden, bei denen die Seite, an der eine freie Aldehydgruppe entsteht, als reduzierende Seite bezeichnet, da sie oxidiert werden kann. An beiden freien Enden können die Exocellulasen (auch Cellobiohydrolasen) angreifen und Cellobiosen, also Disaccharide aus zwei Glukosemolekülen, freisetzen. Dabei werden die Exocellulasen unterteilt in Exocellulasen, die von der reduzierenden und Exocellulasen, die von der nichtreduzierenden Seite der Cellulose angreifen. Die freigesetzte Cellobiose wird anschließend von den  $\beta$ -Glukosidasen zu einzelnen Glukosemolekülen gespalten.



**Abbildung 3.6: Enzymatischer Abbau von Cellulose**

Zum Abbau von Cellulose müssen die kristallinen Bereiche in amorphe Bereiche übergehen, was durch die Einlagerung des Proteins Swollenin unterstützt wird, sodass die Endocellulasen die Cellulosestränge zufällig schneiden können. Die so entstehenden reduzierenden und nicht-reduzierenden Enden können dann durch die entsprechenden Exocellulasen (Cellobiohydrolasen) in Cellobiose gespalten werden. Diese Disaccharide werden wiederum durch die β-Glukosidase zu Glukose gespalten.

Xylan wird ähnlich in die einzelnen Zuckerbestandteile abgebaut, wie die Cellulose (Abbildung 3.7): Die Endo-1,4-β-Xylanase (Xylanase, 1,4-β-D-Xylan Xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) spaltet Xylanstränge in der Mitte, sodass kürzere Stränge entstehen. Im Gegensatz zu den Cellulasen existiert jedoch kein Exo-Enzym. Die β-D-Xylosidase (1,4-β-D-Xylan Xylohydrolase; EC 3.2.1.37) spaltet die Bruchstücke des Xylans direkt in Xylosemoleküle. Da dieses Enzym auch längere Stücke als Xylobiasen als Substrate nutzt, greift es ebenfalls an den freien Enden der Xylooligosaccharide an. Neben diesen Hauptenzymen existieren weitere wie die Acetylxylanesterase (EC 3.1.1.6) sowie die Endo- und Exo-Arabinasen (EC 3.2.1.99 und EC 3.2.1.55), die Zucker oder an die Xylosekette gebundene Seitengruppen, von dieser abspalten (Polizeli et al., 2005, Saha et al., 2009).



**Abbildung 3.7: Xylanasen (nach Collins, 2005; Polizeli et al., 2005)**

Xylan ist im Aufbau heterogener als Cellulose. Es besitzt eine  $\beta(1-4)$ -glykosidisch verknüpfte Xylosekette, an die Hexosen, Pentosen und weitere Seitengruppen gebunden sind. Die Xylosekette wird durch die Xylanase (Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase, EC 3.2.1.8) in kleinere Ketten geschnitten. Von diesen kurzen Ketten oder Xylobiosen kann die  $\beta$ -D-Xylosidase (4- $\beta$ -D-Xylan Xylohydrolase; EC 3.2.1.37) wiederum einzelne Xylosemoleküle abtrennen. An den Seitengruppen des Xylans greifen weitere Hydrolasen wie Acetylxylanesterase und Arabinofuranosidasen an.

### 3.2.2 Produzenten von Cellulasen und Hemicellulasen

Die Produktion von Enzymen zur Hydrolyse von Lignocellulose wird für viele Mikroorganismen beschrieben. Die Enzyme von gut bekannten Organismen wie *Aspergillus spp.*, *Bacillus spp.* und *Trichoderma spp.* sind dabei am besten untersucht. Die Pilze *Aspergillus* und *Trichoderma* sekretieren die Enzyme in ihre Umgebung, wohingegen *Bacillus* einen Teil der Enzyme als Cellulosome, also als Komplex mit mehreren Enzymen, produziert. Für die Produktion von Cellulasen und Hemicellulasen wird vor allem die Nutzung von *Trichoderma spp.* und *Aspergillus spp.* beschrieben, die beide auch in dieser Arbeit verwendet wurden (Saha et al., 2009).

*Trichoderma reesei* gehört der Klasse der Schlauchpilze (Ascomycota) an, der auch die meisten Hefen zugeordnet sind. Bis vor einigen Jahren war die sexuelle Form die *Hypocrea spp.* nicht bekannt, weswegen er fälschlicherweise zu den Deuteromycota klassifiziert wurde. *Trichoderma* kommt in der Natur als saprophytischer und mesophiler Organismus im Boden, auf Pflanzenresten oder auf Holz vor und ist in der Lage, Holz und Pflanzenreste durch extrazelluläre Enzyme zu zersetzen. Zudem kann er durch Fungizide und Antibiotika sein Habitat gegenüber anderen Mikroorganismen verteidigen. Einige Arten können daher auch als

Antagonisten zum Schutz von Pflanzen eingesetzt werden (Schuster und Schmoll, 2010). *Trichoderma* bildet auf Oberflächen ein weißes Myzel aus, das sich durch die Sporen auf den Konidiophoren grün bis gelb färben kann. *Trichoderma spp.* werden in der Industrie vor allem für die Produktion von Enzymen eingesetzt. *T. reesei* QM6a wurde während des zweiten Weltkriegs von Zelten der US-Army isoliert, die durch diesen besonders stark zersetzt wurden (Reese, 1976). In den 70er Jahren trat das ökonomische Potential der Cellulasen in das Bewusstsein der Forscher und der Stamm wurde über klassische Wege mutiert und optimiert. Besonders die Stämme *T. reesei* QM9414 und RUT-C30, die 1971 und 1977 isoliert wurden, sind auch heute noch in der Forschung die meistverwendeten Stämme (Esterbauer et al., 1991). Der Stamm RUT-C30, der über RUT-M7 und RUT-NG14 von dem ursprünglichen Stamm QM6a abstammt, fand in dieser Arbeit Verwendung.

Die Cellulasen sind umfassend untersucht. So besitzt *T. reesei* acht Gene für Endoglucanasen (EG) (Aaro et al., 2005), von denen EG I und EG II von besonderer Wichtigkeit sind. Insgesamt machen die vier Endoglucanasen EG I-IV 15 % des sekretierten Proteins aus (Merino und Cherry, 2007) und schneiden, wie bereits beschrieben, zufällig in der Mitte der Cellulosestränge. Die wichtigsten Exocellulasen sind die Cellobiohydrolase 1 und 2 (CBH1 und CBH2), die 60 % und 20 % des sekretierten Proteins darstellen (Merino und Cherry, 2007). Die CBH1 entfernt Cellobioside von der reduzierenden Seite des Cellulosestrangs, wohingegen die CBH2 von der nicht-reduzierenden Seite angreift. Aufgrund ihrer Menge und Funktion sind diese Cellulasen die wichtigsten im Cellulasesystem von *Trichoderma*. Da sie jedoch durch höhere Cellobiosekonzentrationen inhibiert werden, ist die Funktion der  $\beta$ -Glukosidasen BGL I und II, die die Disaccharide weiter zu Glukosemolekülen spalten, ebenfalls wichtig. Neben den hydrolytischen Enzymen spielt das Expansin Swollenin (SWOI) eine wichtige Rolle bei der Zersetzung von Cellulose. Es zeigt eine starke Homologie zu pflanzlichen Proteinen und löst die Wasserstoffbrückenbindungen in kristalliner Cellulose. Hierdurch werden diese amorph wodurch der Angriff der Endoglucanasen in diesem Bereich ermöglicht wird (Saloheimo et al., 2002).

Der Pilz *Aspergillus* gehört ebenfalls der Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota) an, die sich generell sexuell vermehren können. Die meisten in der Biotechnologie verwendeten Arten vermehren sich jedoch asexuell. Dabei ist häufig nicht bekannt, ob es zu diesen eine teleomorphe Form gibt. Daher werden diese Arten den *Fungi imperfecti* zugeordnet. Der Gattung *Aspergillus* gehören über 350 weltweit vorkommende Arten an. Sie tragen als Saprobionten einen wesentlichen Teil zum ökologischen Kreislauf bei. Einige Arten sind für den Menschen pathogen und können unter anderem Aspergillose verursachen. Weiterhin bilden manche Arten Toxine, weswegen vom Verzehr befallener Lebensmittel abzuraten ist. Auf festen Oberflächen bilden die *Aspergilli* einen Myzelrasen, der je nach Art unterschiedliche Farben annehmen kann. *Aspergillus* bildet Konidiophoren aus, an deren Kopf sich die Konidien befinden. Die Sektion *Nigri* besitzt charakteristische schwarze Konidien, die besonders von *Aspergillus niger* bekannt sind. Neben dieser in der Biotechnologie unter anderem zur Produktion von Zitronensäure bekannten Art gehört auch

*A. aculeatus* in diese Sektion. Beide sind Pflanzenpathogene und besitzen eine Vielzahl an pflanzenwandabbauenden Enzymen. In den *Aspergillus spp.* existieren nahezu alle Enzyme, die für den Abbau von lignocellulosehaltigen Pflanzenteilen benötigt werden (de Vries, 2003). Es wurden nahezu 20 Gene kloniert, die für Endoxylanasen und  $\beta$ -Xylosidasen kodieren (Aaro et al., 2005). Für *A. aculeatus* wurden die drei Endoglukanasen FIa, FIb und FIII näher beschrieben (Fujimoto et al., 1995). Weiterhin wurden eine Mannanase (Christgau et al., 1994), Galaktanase (Christgau et al., 1995), Glukanase (Pauly et al., 1999) und Arabinase (Skjot et al., 2001) untersucht, was das breite Spektrum an hydrolytischen Enzymen in *A. aculeatus* demonstriert. Nachdem *A. aculeatus* CBS 101.42 (DSM2344) zu Beginn der kommerziellen Xylanaseproduktion für die Produktion von Shearzyme<sup>®</sup> (Novozymes, Dänemark) genutzt wurde (Kofod et al., 1994), wird dieses Produkt heutzutage als ein Gemisch aus verschiedenen Enzymen vertrieben. Es enthält heute nur noch eine GH10 Xylanase aus *A. aculeatus*, die jedoch mit *A. oryzae* produziert wird (Rantanen et al., 2007). Dieser Stamm wurde in der vorliegenden Arbeit für die Produktion von Xylanasen und  $\beta$ -Xylosidasen verwendet.

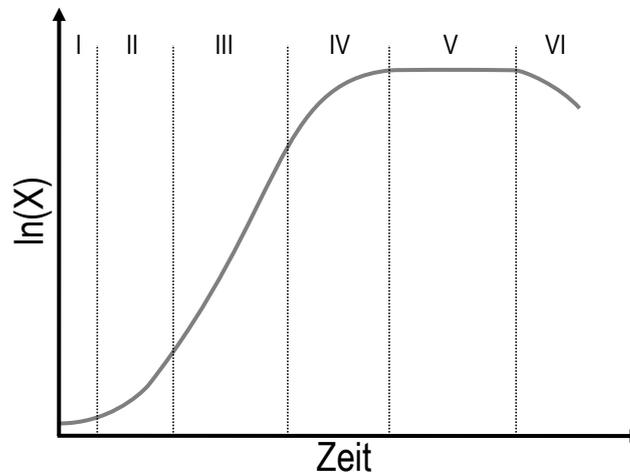
### **3.3 Grundlagen der biotechnologischen Produktion**

Die Produktion biotechnologischer Produkte setzt neben einer Kenntnis der Produkte auch ausreichend Wissen über die Organismen und geeignete Produktionsbedingungen voraus. Hierzu gehören die Wachstums- und Produktbildungskinetik des Produktionsorganismus (Kapitel 3.3.1), sowie die mathematische Beschreibung der Prozessführung (Kapitel 3.3.2). Die dargestellten Zusammenhänge sind, wenn nicht weiter gekennzeichnet, aus den Quellen Chmiel (2006), Doran (1995) und Villadsen et al. (2011) zusammengefasst.

#### **3.3.1 Kinetik des Wachstums**

Die Wachstumskinetik von Mikroorganismen stellt einen wichtigen Prozessparameter in der biotechnologischen Produktion dar. In der Regel hängt die Produktbildungsrate von den Wachstumsphasen des Organismus ab. Aus diesem Grund ist die Kenntnis über die Wachstumsphase mit der höchsten Produktbildungsrate und der Aufrechterhaltung dieser Phase über einen möglichst langen Zeitraum entscheidend. Generell kann das Wachstum von Mikroorganismen in sechs Phasen eingeteilt werden (Abbildung 3.8). Zu Beginn eines Satzprozesses mit ausreichend Nährstoff steht die Adaptionsphase oder Verzögerungsphase (I), in der kein Wachstum zu beobachten ist und die Organismen sich an die neuen Bedingungen anpassen. In der Übergangsphase (II) beginnt das Wachstum, das anschließend in das exponentielle Wachstum (III) übergeht. Treten Substratlimitierungen oder wachstumshemmende Bedingungen auf, geht die Kultur in die zweite Übergangsphase

(IV) über, die kein exponentielles Wachstum mehr aufweist. In der stationären Phase (V) liegt in der Regel kein Substrat mehr vor und es werden die meisten Sekundärmetabolite produziert bevor die Absterbephase (VI) einsetzt.



**Abbildung 3.8: Wachstumskurve von Mikroorganismen**

Die Wachstumskurve eines Satzprozesses lässt sich bei der Betrachtung der gesamten Biomasse einer Kultur in sechs Bereiche einteilen: (I) Verzögerungsphase, (II) Übergangsphase I, (III) exponentielles Wachstum, (IV) Übergangsphase II, (V) stationäre Phase, (VI) Absterbephase.

### 3.3.1.1 Einzeller

Die Vermehrung von einzelligen Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen erfolgt durch Zellteilung oder Sprossung, wodurch zwei eigenständige und gleichberechtigte Organismen entstehen. Unter nicht limitierenden Bedingungen, lässt sich die Zunahme an Organismen durch eine exponentielle Funktion beschreiben und die Zellen befinden sich in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 3.8). Die Zunahme kann dabei sowohl anhand der Zellzahl als auch in den korrelierenden Parametern wie optische Dichte oder Biotrockenmasse gemessen werden. Die Zeit, die der Mikroorganismus zur Teilung benötigt, bestimmt daher die maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ). Dies bedeutet, dass die DNA verdoppelt werden muss, die Zelle wächst und sich in zwei Teile mit abgeschlossenen Zellwänden trennt. Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  (in  $\text{h}^{-1}$ ) der Kultur im exponentiellen Wachstum wird auf die Biotrockenmasse  $c_x$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) bezogen und lässt sich nach Gleichung 3.5 definieren.

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

Gleichung 3.5

### 3.3.1.2 Myzelbildner

Das Wachstum von filamentösen Pilzen muss differenzierter betrachtet werden als das der Einzeller. Bei der Beschreibung des Wachstums, zum Beispiel anhand der Biotrockenmasse

(BTM), kann ebenfalls das in Abbildung 3.8 beschriebene Verhalten beobachtet und Gleichung 3.5 verwendet werden.

Papagianni (2003) fasst das Wachstum der einzelnen Organismen und der von Myzelbildnern häufig gebildeten Pellets zusammen: Das Hyphenwachstum kann in mehrere Phasen eingeteilt werden. Die Hyphen wachsen nur polar auf der vom Sporulationspunkt abgewandten Spitze. Zu Beginn wächst die Hyphe exponentiell und geht dann, abhängig vom Organismus nach einer bestimmten Länge in ein lineares Wachstum über. Durch die längeren Transportwege in der Hyphe werden diese zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, welcher das lineare Wachstum vorgibt. Zudem kommt es in den Zellen ab einer bestimmten Länge der Zelle zur Ausbildung einer neuen Zelle durch Mitose. Die zusätzlich vorhandene Membran reduziert den Stofftransport vom Sporulationspunkt zur Spitze der Hyphe erneut, wodurch sich die Stoffaufnahme vor allem auf das neue Kompartiment beschränkt. Neben dem Wachstum der Hyphe findet häufig eine Verzweigung statt. So teilt sich die wachsende Spitze zu Beginn wenig und dann regelmäßig in neue Zweige. Die Mischung aus linearem Wachstum der Hyphe, Erhöhung des Zellvolumens und der Teilung der Spitzen führt also zu einem exponentiellen Wachstum der Zellmasse (Steele und Trinci, 1975).

Das Wachstum von Pellets zeigt im Vergleich zum Wachstum der Hyphen weitere Effekte, die die Kinetik beeinflussen. So hängt das Wachstum vor allem von der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff ab. Das Wachstum des Pellets  $M$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) folgt dabei – ausgehend von der Pelletmasse zum Startzeitpunkt ( $M_0$ ) – dem sogenannten Kubikwurzelgesetz mit dem kinetischen Parameter  $k$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , Gleichung 3.6, Emmerson, 1950).

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + k \cdot t \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Dieser Zusammenhang gilt jedoch nur zu Beginn des Wachstums. Um das Gesetz über den gesamten Zeitraum des Pelletwachstums anwenden zu können, wurde es erweitert. Es wurde weiterhin angenommen, dass nur eine äußere Schicht des Pellets mit der Größe  $w$  (in m) wachsen kann, da nur in dieser die Nährstoffversorgung für das Wachstum ausreichend ist. Diese wachsende Schicht mit der Dichte des Pellets  $\rho_p$  (in  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ), die mit der Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  wächst, wird durch den kinetischen Parameter  $k$  beschrieben (Gleichung 3.7, Pirt, 1966).

$$k = \left( \frac{4}{3} \pi \cdot \rho_p \right)^{1/3} \cdot \mu \cdot w \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Durch das Einsetzen von  $k$  in Gleichung 3.6 und die Erweiterung mit der Anzahl der Pellets  $n$ , ergibt sich die Massenänderung während des exponentiellen Wachstums mit Pellets zu Gleichung 3.8.

$$M = M_0 + \left( \frac{4}{3} \pi \cdot \rho_p \cdot n \right)^{1/3} \cdot \mu \cdot w \cdot t \quad \text{Gleichung 3.8}$$

### 3.3.2 Prozessführung

Die Führung eines biotechnologischen Prozesses bietet – ähnlich wie die Stammentwicklung – ein großes Potential für den gesamten Prozess und dessen Leistungsfähigkeit. Dabei wird die Wachstumsrate  $\mu$  häufig bewusst durch die Konzentration eines limitierenden Substrats  $c_S$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) limitiert. Die resultierende Wachstumsrate hängt weiterhin von der Sättigungskonzentration des Substrats  $K_S$  (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ab (Gleichung 3.9; Monod, 1949).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Ebenso wie für die Formalkinetik ist die Substratkonzentration für die Substrataufnahmerate von Bedeutung. Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , Gleichung 3.10) wird dabei in Analogie zur Wachstumsrate  $\mu$  (Gleichung 3.4) und der spezifischen Produktbildungsrate  $q_P$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , Gleichung 3.11) definiert.

$$q_S \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

$$q_P \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Die spezifische Substrataufnahmerate beschreibt die Gesamtheit des benötigten Substrats und kann wiederum in die Substrataufnahmerate für die Produktbildung  $q_{S,P}$ , für das Zellwachstum  $q_{S,\mu}$  und für den Erhaltungsstoffwechsel  $q_{S,m}$  unterteilt werden (Gleichung 3.12).

$$q_S = q_{S,P} + q_{S,\mu} + q_{S,m} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Für einen effizienten Prozess ist es wünschenswert, möglichst wenig Substrat für den Erhaltungsstoffwechsel und das Zellwachstum aufbringen zu müssen, da diese eingebrachte Energie nicht im Endprodukt auftaucht. Zur Bildung der differentiellen Ertragskoeffizienten beziehungsweise Ausbeuten der Biomasse  $Y_{X/S}^*$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) und des Produkts  $Y_{P/S}^*$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) können die Aufnahmeraten und die Produktbildungsraten verknüpft werden (Gleichung 3.13 und 3.14).

$$Y_{X/S}^* = \frac{\mu}{q_S} = \frac{dc_X/dc_t}{dc_S/dc_t} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

$$Y_{P/S}^* = \frac{q_P}{q_S} = \frac{dc_P/dc_t}{dc_S/dc_t} = \frac{dc_P}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Die differentiellen Ausbeuten geben je nach Größe des betrachteten Intervalls nur einen Ausschnitt der Kultivierung an. Sie sind sinnvoll, um einen Prozess in kleine Abschnitte zu unterteilen und die Prozessabschnitte mit den höchsten differentiellen Ausbeuten zu bestimmen. Für die Leistungsfähigkeit des gesamten Prozesses sind die integralen Ausbeuten der Biomasse  $Y_{X/S}$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) und des Produkts  $Y_{P/S}$  (in  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) besser geeignet (Gleichung 3.15 und 3.16).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta c_X|_{t_0}^t}{\Delta c_S|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta c_P|_{t_0}^t}{\Delta c_S|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

### 3.3.2.1 Sauerstoff

Sauerstoff stellt bei aeroben Prozessen neben den Medienbestandteilen ein wichtiges Substrat dar. Die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff ist jedoch aufgrund der niedrigen Löslichkeit in Wasser nur durch kontinuierliche Begasung des Mediums zu gewährleisten. Bei der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff muss dieser aus der Gasphase der Gasblasen in das Medium übergehen. Nach dem Zweifilmmodell gibt es zwei Transportwiderstände, die überwunden werden müssen (Abbildung 3.9), nämlich der Transport des Sauerstoffs

- aus der Gasphase an die Grenzfläche und
- von der Grenzfläche in die flüssige Phase.

Nach dem Zweifilmmodell werden die Konzentrationen des Sauerstoffs im Gas, in der Flüssigkeit und an der Grenzfläche betrachtet. Da sich auf beiden Seiten der Grenzfläche ein Gleichgewicht einstellt und aufgrund des hohen Diffusionskoeffizienten von Gasen, ist das treibende Gefälle die Konzentrationsdifferenz des Sauerstoffs  $\Delta c_{O_2}$  (in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  oder  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) zwischen der flüssigkeitsseitigen Grenzfläche-  $c_L^*$  und der Gasphase  $c_G$ . Die Übergangsgeschwindigkeit ist dabei durch den Stofftransportkoeffizienten  $k_L$  (in  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) in der Flüssigkeitsgrenzschicht bestimmt. Mithilfe der gesamten volumenbezogenen Grenzfläche  $a$  (in  $\text{m}^2$ ) kann nun der volumenbezogene Sauerstoffübergang  $OTR$  (*Oxygen Transfer Rate* in  $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$  oder  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ) formuliert werden (Gleichung 3.17).

$$OTR = k_L a \cdot (c_L^* - c_L) = k_L a \cdot \Delta c_{O_2} \quad \text{Gleichung 3.17}$$

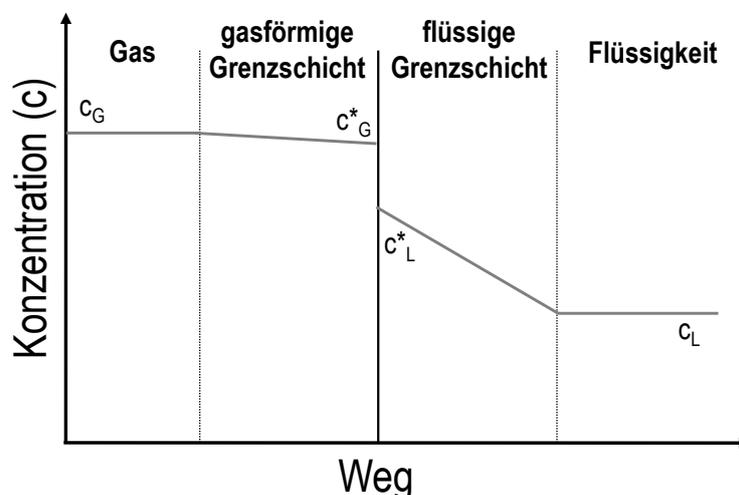


Abbildung 3.9: Zweifilmmodell und Sauerstoffübergang (nach Villadsen et al., 2011)

Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass es drei Möglichkeiten gibt, den Sauerstofftransport in das Medium zu erhöhen. Dies kann zum einen durch die Vergrößerung des Stofftransportkoeffizienten  $k_L$  geschehen, indem die Breite der flüssigkeitsseitigen Phasengrenzschicht verkleinert wird. Zum anderen kann die Fläche der Phasengrenze  $a$  erhöht werden. Da diese beiden Parameter in der Regel über die gleichen Maßnahmen erhöht werden und schwer getrennt messbar sind, werden sie als  $k_L a$  meist zusammenhängend betrachtet. Zu den Maßnahmen zur Verbesserung des Übergangs gehören eine Erhöhung des Leistungseintrags (Rührerdrehzahl im Rührkessel) sowie die gekoppelte Verkleinerung der Blasen. Hierdurch wird eine Erhöhung der volumenbezogenen Grenzfläche  $a$  und durch die schnellere Flüssigkeitsbewegung eine Verkleinerung der Phasengrenzschicht, also eine Erhöhung des Sauerstofftransportkoeffizienten  $k_L$ , erreicht. Auch eine Erhöhung des Gasdurchsatzes bis zu einer Menge, die keine Überflutung des Rührers verursacht, zeigt die gleichen Effekte im Reaktor. Neben diesen Parametern kann auch der Gradient der Sauerstoffkonzentration  $\Delta c_{O_2}$  erhöht werden. Hierfür muss die Sauerstoffkonzentration an der Phasengrenze durch Erhöhung des Drucks oder der Sauerstoffkonzentration im Gas vergrößert werden. Dieser Zusammenhang ist durch die Proportionalität der beiden Konzentrationen gegeben, die durch das Henry-Gesetz beschrieben wird (Gleichung 3.18).

$$p_i = c_L \cdot H \quad \text{Gleichung 3.18}$$

Dabei ist der Partialdruck des Stoffes im Gas  $p_i$  (in Pa) proportional zur Konzentration in der Flüssigkeit  $c_L$ . Die Konzentration hängt desweiteren von der Henry-Konstante  $H$  (in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$  oder  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ) ab, die eine Abhängigkeit von der Temperatur zeigt.

Damit im Reaktor keine Sauerstofflimitationen auftreten, muss die *Oxygen Transfer Rate* (*OTR*) mindestens so groß sein wie die Sauerstoffaufnahme *OUR* (*Oxygen Uptake Rate* in  $\text{mg} \cdot \text{s}^{-1}$  oder  $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ), wobei die spezifische Sauerstoffaufnahme  $q_{O_2}$  analog zu Gleichung 3.10 gebildet wird (Gleichung 3.19).

$$OUR = c_x \cdot q_{O_2} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

### 3.3.2.2 Der ideale Rührkesselreaktor

Die Beschreibung von Reaktionen in einem Rührkesselreaktor ist aufgrund der Komplexität nur mithilfe von Vereinfachungen möglich. Der ideale Rührkessel für biologische Prozesse stellt eine Modellannahme dar, mit der Reaktionsverläufe im Laborrührkesselreaktor einfach abgeschätzt werden können. Unter der Annahme, dass es sich um einen idealen Rührkessel handelt, werden konstante Temperaturen und Stoffkonzentrationen sowie eine gleichmäßige Durchmischung ohne Totzonen im gesamten Reaktor vorausgesetzt. Eine Temperaturänderung oder Konzentrationsänderung eines Stoffes findet bei einer Änderung des Ortes  $x$  im Reaktor nicht statt, kann aber mit der Zeit variieren (Gleichung 3.20, Abbildung 3.10).

$$\frac{dT}{dx} = 0; \quad \frac{dc}{dx} = 0 \quad \text{Gleichung 3.20}$$

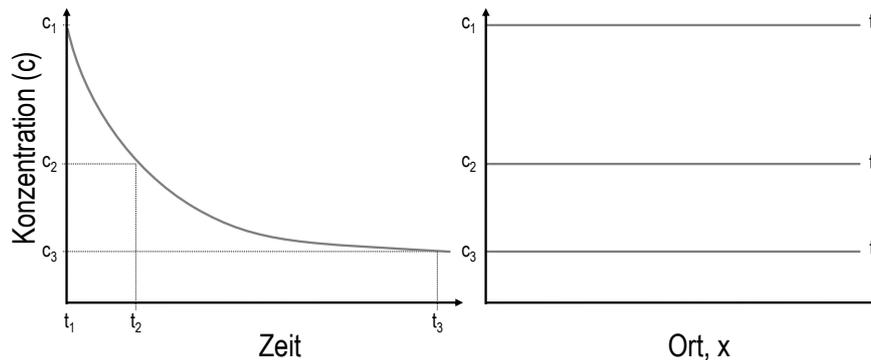


Abbildung 3.10: Zeitliche und örtliche Konzentrationsverläufe im idealen Rührkesselreaktor

Die Bilanzgleichung des Rührkesselreaktors hängt von den auf den Reaktor bezogenen Volumenströmen in  $F_{ein}$  (in  $L \cdot \text{min}^{-1}$ ) und aus dem Reaktor  $F_{aus}$  (in  $L \cdot \text{min}^{-1}$ ) ab. Diese bewirken eine Änderung im entsprechenden Volumen  $V$  und, je nach Konzentration des Stoffes  $i$ , in dessen Stoffkonzentration  $c_i$ . Zudem beschreibt die Reaktionsvariable  $r_i$  (in  $s^{-1}$ ) durch einen Verbrauch oder durch die Produktion des Stoffes dessen Änderung in dem Reaktionsvolumen (Gleichung 3.21, Chmiel, 2006).

$$\frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V \quad \text{Gleichung 3.21}$$

Je nach Betriebsweise des Reaktors ändert sich die zu betrachtende Massenbilanz.

### Satzverfahren

Bei einer Kultivierung nach einem einfachen Satzverfahren im Rührkesselreaktor werden die Medienbestandteile und das Lösungsmittel im Reaktor vorgelegt. Während der Kultivierungen werden nur Korrekturmittel zur Anpassung des pH hinzugegeben und eventuell Proben genommen. Hierdurch kann das Reaktorvolumen  $V_R$  als konstant angenommen werden. In der Massenbilanz (Gleichung 3.21) entfallen die Volumenströme  $F_{ein}$  und  $F_{aus}$ . Somit ergibt sich die vereinfachte Massenbilanz zu (Gleichung 3.22)

$$\frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = r_i \cdot V \quad \text{Gleichung 3.22}$$

die aufgrund des konstanten Volumens im Reaktionsgefäß, also  $dV/dt = 0$ , weiter vereinfacht werden kann (Gleichung 3.23).

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad \text{Gleichung 3.23}$$

Die Änderungen von Stoffkonzentrationen hängen also einzig von der Reaktionsrate  $r_i$  des betrachteten Stoffes ab. Mit Hilfe des einfachen formalkinetischen Sättigungsansatzes (Gleichung 3.5) lässt sich die Änderung der Zellmasse für das exponentielle Wachstum im idealen Rührkessel herleiten. Durch Kombination mit Gleichung 3.8, 3.9 und 3.12 ergibt sich

unter der Annahme, dass die Substratkonzentration  $c_S$  wesentlich größer als  $K_S$  ist, für den Zeitraum  $t$  bis  $t_0$ , während des exponentiellen Wachstums die Abhängigkeit der Zellmasse  $c_x$  von der Zeit (Gleichung 3.24).

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot (t-t_0)} \quad \text{Gleichung 3.24}$$

### Zulaufverfahren

Bei Zulaufverfahren wird während oder nach Abschluss der Satzphase ein Zulaufvolumenstrom  $F_{ein}$  gestartet, der ein weiteres Wachstum und die Stoffproduktion ermöglicht. Aus der Massenbilanz (Gleichung 3.21) wird also im Gegensatz zum Satzverfahren nur der Ausgangsterm ( $F_{aus}$ ) eliminiert. So ergibt sich die Massenbilanz für ein Zulaufverfahren (Gleichung 3.25).

$$\frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = c_i \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dc_i}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V \quad \text{Gleichung 3.25}$$

Die Änderung der Substratkonzentration im Reaktionsgefäß hängt in diesem Fall von zwei Variablen ab, nämlich von der Reaktionsrate und von der zugegebenen Menge an Substrat. Die Änderung der Substratkonzentration lässt sich durch die Massenbilanz der Substrataufnahmerate erhalten (Gleichung 3.26), wobei  $F_{ein}/V = D$  auch die Verdünnungsrate darstellt:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{F_{ein}}{V} \cdot (c_{S,ein} - c_S) - c_x \cdot q_S \quad \text{Gleichung 3.26}$$

Analog zu dieser lassen sich die Massenbilanzen für das Zellwachstum und die Produktbildung erstellen (Gleichung 3.27 und 3.28).

$$\frac{dc_x}{dt} = -\frac{F_{ein}}{V} \cdot c_x + c_x \cdot \mu \quad \text{Gleichung 3.27}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = -\frac{F_{ein}}{V} \cdot c_P + c_x \cdot q_P \quad \text{Gleichung 3.28}$$

Unter der Voraussetzung, dass die Substratkonzentration  $c_{S,ein}$  groß im Verhältnis zu  $c_S$  ist und der Zulaufvolumenstrom  $F_{ein}$  dadurch klein im Verhältnis zu dem Gesamtvolumen  $V$  wird, kann die Verdünnung vernachlässigt werden und Gleichung 3.27 vereinfacht sich zu (Gleichung 3.29):

$$\frac{dc_x}{dt} = c_x \cdot \mu \quad \text{Gleichung 3.29}$$

Für die Annahme einer konstanten Wachstumsrate  $\mu$  und unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels lässt sich das exponentielle Wachstum von einer Zellkonzentration  $c_{x,0}$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  ausgehend berechnen (Gleichung 3.30).

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu t} \quad \text{Gleichung 3.30}$$

Für  $\mu = konst.$  gilt weiterhin, dass die Substratzugabe gleich der Substrataufnahmerate ist, also  $dc_S/dt = 0$  gilt und die Substrataufnahme nur für das Zellwachstum verwendet wird

(Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels). Mit diesen Annahmen wird lässt sich aus Gleichung 3.26 und 3.30 die Gleichung 3.31 erhalten.

$$F_{ein} = q_S \cdot \frac{V_0}{c_{S,ein}} \cdot c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.31}$$

Ist die Substrataufnahmerate  $q_S$  nicht bekannt, kann über Gleichung 3.13 stattdessen der differentielle Ertragskoeffizient  $Y_{X/S}^*$  verwendet werden (Gleichung 3.32):

$$F_{ein} = \frac{\mu}{Y_{X/S}^*} \cdot \frac{V_0}{c_{S,ein}} \cdot c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.32}$$

Für das Festlegen einer gewünschten Wachstumsrate ergibt sich also eine direkt zugehörige exponentielle Zulauftrate, mit der der Prozess gesteuert werden kann. Diese Zusammenhänge lassen sich nur annehmen, solange keine weiteren Limitierungen oder Inhibierungen im Reaktor auftreten. Durch die schnelle Zunahme an Biomasse kommt es bei einem exponentiellen Wachstum jedoch leicht zu Sauerstofflimitationen. In der Praxis finden häufig konstante Volumenströme im Zulauf ihre Anwendung. Für die Formulierung dieses Problems wird angenommen, dass die Zulauftrate  $F_{ein}$  und der Ertragskoeffizient  $Y_{X/S}^*$  konstant sind. Durch die Kombination aus Gleichung 3.29 und 3.13 und durch das Vernachlässigen des Erhaltungsstoffwechsels lässt sich Gleichung 3.33 erhalten:

$$\frac{dc_x}{dt} = c_x \cdot q_S \cdot Y_{X/S} \quad \text{Gleichung 3.33}$$

Mit der Annahme, dass  $F_{ein} \cdot c_{S,ein} / (V \cdot c_x) \leq q_{S,max}$  ist und  $c_S = 0$ , findet keine Änderung der Substratkonzentration im Reaktor statt, so dass  $dc_S/dt = 0$  gilt und durch Einsetzen von Gleichung 3.26 und Integration ergibt sich Gleichung 3.34.

$$c_x = c_{x,0} + \frac{F_{ein} \cdot c_{S,ein}}{V} \cdot Y_{X/S}^* \cdot t \quad \text{Gleichung 3.34}$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich eine lineare Zunahme der Zellkonzentration für die  $dc_x/dt = konst.$  gilt. Mit dieser Annahme ergibt sich analog zu Gleichung 3.27 sowohl bei zunehmendem Volumen als auch bei zunehmender Zellkonzentration  $c_x$  im Reaktor eine Abnahme der Wachstumsrate (Gleichung 3.35).

$$\mu = \frac{konst}{c_x} + \frac{F_{ein}}{V} \quad \text{Gleichung 3.35}$$

Ist jedoch die Substratzufuhr größer als  $q_{S,max}$ , so wird  $c_S > 0$  und  $\mu$  ändert sich analog zu Gleichung 3.9. Hierdurch ergibt sich ein Wachstum nach Gleichung 3.30 mit einem von  $c_S$  abhängigen  $\mu$ .

### 3.3.2.3 Rheologisches Verhalten

Bei der Kultivierung von filamentösen Pilzen treten als Funktion der Prozesszeit starke Änderungen im rheologischen Verhalten des Reaktionsmediums auf. Während des Wachstums des Myzels verhaken sich die Hyphen ineinander, wodurch sich das

Fließverhalten in Abhängigkeit der mittleren Hyphenlänge und der Zellmasse verändert. Das Medium zeigt dabei ein nicht-newtonsches Fließverhalten. Das heißt, dass sich nur eine scheinbare Viskosität  $\eta_{sch}$  (in Pa·s) bestimmen lässt, die nicht linear zur Schubspannung ist und mit zunehmender Schergeschwindigkeit  $\gamma$  (in  $s^{-1}$ ) abnimmt. Die Beschreibung der Viskosität der Fermentationslösung lässt sich deshalb am besten mit dem Oswald-de Waele-Gesetz beschreiben (Henzler, 2007). Bedingt durch die Strukturviskosität ist der Fließindex  $m$  dabei kleiner  $m = 1$ .

$$\eta_{sch} = K \cdot \gamma^{m-1} \quad \text{Gleichung 3.36}$$

Während des Wachstums von myzelbildenden Organismen nimmt der Konsistenzindex  $K$  (in  $Pa \cdot s^m$ ) in Abhängigkeit von der Biomasse zu. Gleichzeitig nimmt der Fließindex ab, sodass eine höhere Viskosität in der Flüssigphase gemessen wird (Henzler und Schäfer, 1987). Ab einer bestimmten Prozesszeit, die abhängig von dem Organismus und den Prozessbedingungen ist, nimmt der Konsistenzindex wieder ab und der Fließindex zu. Es wird angenommen, dass dies mit einer Änderung in der Myzelstruktur verbunden ist, die sich aufgrund von mangelnden Substraten verändert (Henzler und Schäfer, 1987). Die Viskosität im Medium hat einen starken Effekt auf das Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften in der Flüssigkeit, das durch die dimensionslose Reynoldszahl beschrieben wird. Diese zeigt dabei eine umgekehrte Proportionalität zur Viskosität (Gleichung 3.37).

$$Re = d^2 \cdot n \cdot \rho \cdot \eta_{sch}^{-1} \quad \text{Gleichung 3.37}$$

Da die Viskosität sich in den nicht-newtonischen Lösungen mit der Prozesszeit und der Rührerdrehzahl ändert, müsste zur Berechnung der Reynoldszahl für jeden Betriebspunkt die scheinbare Viskosität bestimmt werden. Durch eine höhere Viskosität verringert sich die Turbulenz im System und die Mischzeiten nehmen zu (Olsvik und Kristiansen, 1994). Hierdurch können sich vermehrt Totzonen ausbilden, in denen die Versorgung mit Substrat, Korrekturmittel und vor allem Sauerstoff verschlechtert ist. Ruy und Humphrey (1972) fanden dazu eine empirische Korrelation des  $k_L a$  für nicht-newtonische Fluide die von der scheinbaren Viskosität abhängt (Gleichung 3.38).

$$k_L a = \left( \frac{P}{V} \right)^a \cdot u_G^b \cdot \eta_{sch}^c \cdot h \quad \text{Gleichung 3.38}$$

Dabei ist der  $k_L a$  von den Parametern  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und  $h$ , dem volumenspezifischen Leistungseintrag  $P \cdot V^{-1}$  (in  $W \cdot L^{-1}$ ) und der Gasleerrohrgeschwindigkeit  $u_G$  (in  $m \cdot s^{-1}$ ) abhängig. Die Abhängigkeit des  $k_L a$  von der Viskosität hängt nach den Beobachtungen zu Gleichung 3.26 dementsprechend auch mit der Zellkonzentration im Reaktionsmedium zusammen. Die von Deindoerfer und Gaden (1955) beschriebenen Beobachtungen zeigten bei einer Erhöhung der Zellkonzentration von 0 auf  $13,4 \text{ g L}^{-1}$  eine Verringerung des  $k_L a$  um 85 %.

### 3.4 Optimierung von Zulaufverfahren

Zulaufverfahren sind bei biotechnologischen Produktionsprozessen stark verbreitet, da diese Vorteile gegenüber den einfachen Satzprozessen aufweisen. Durch den optimalen Zulaufvolumenstrom kann die Wachstumsrate kontrolliert werden (vgl. Kapitel 3.3.2.2), Substratinhibierungen umgangen und Sauerstofflimitierungen verhindert werden. Häufig stellt sich die Frage nach der optimalen Prozessführung, die im Falle von biotechnologischen Prozessen als Zielgröße zum Beispiel eine Kostenreduzierung, höhere Produktkonzentrationen oder Produkterträge mit sich bringt. Zum Erreichen dieses Ziels müssen die Einflussfaktoren (vgl. Abbildung 3.11) gefunden werden, die den größten Effekt auf diese Zielgröße haben. Durch die Analyse dieser Einflussfaktoren sollen Bedingungen gefunden werden, die die Zielgröße am ehesten an eine gewünschte Größe annähern (Montgomery, 2008).

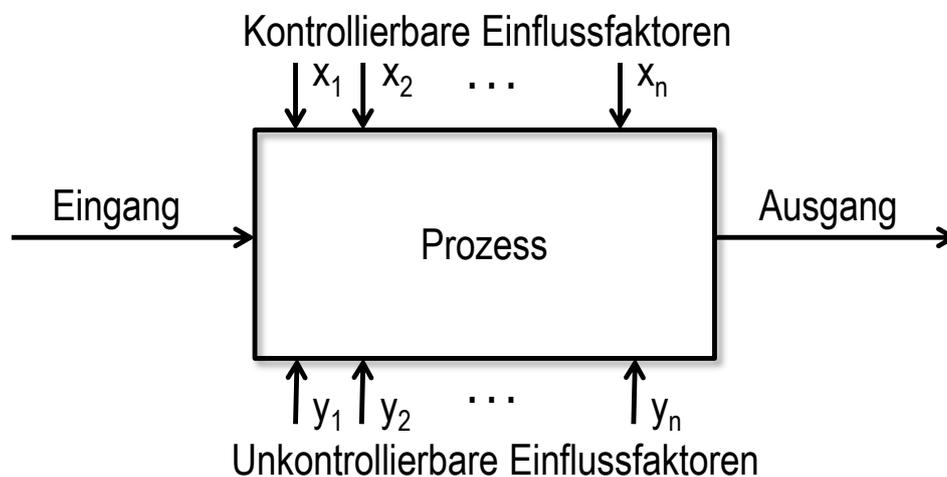
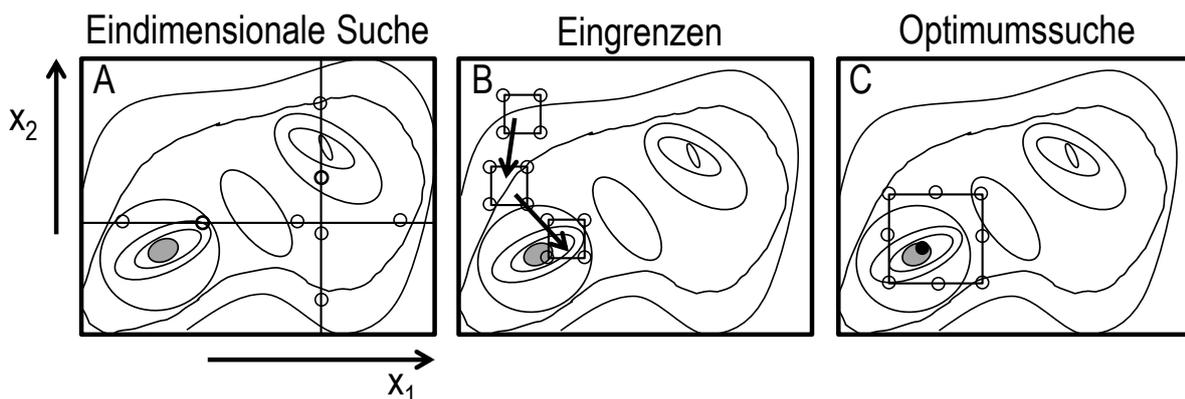


Abbildung 3.11: Darstellung eines allgemeinen Prozesses (aus Montgomery, 2008)

Sind dabei alle zugehörigen Funktionen linear, so handelt es sich um eine lineare Optimierungsaufgabe. Bei Bioprozessen werden jedoch in der Regel nicht-lineare Optimierungsverfahren benötigt, da nicht alle Einflussfaktoren einen linearen Zusammenhang auf die Zielgröße besitzen (Marti und Gröger, 2000). Hinzu kommt, dass Optimierungen von Zulaufprozessen zeitaufwendig sind, da sie meist in Rührkesselreaktoren durchgeführt werden und hierdurch die Anzahl der parallelen Experimente limitiert ist (Altenbach-Rehm et al., 1999). Daher wird durch die Verwendung von statistischen und stochastischen Versuchsplanungen die Anzahl an parallelen oder sequentiellen Experimenten gering gehalten (Kapitel 3.4.1). Neben den experimentellen Optimierungen können modellbasierte Optimierungen durchgeführt werden, bei denen die Optimierung teilweise rein rechnerbasiert durchgeführt wird (Kapitel 3.4.2).

### 3.4.1 Optimierung mit Versuchsplanungen

Die Herangehensweisen an die experimentelle Optimierung von Zulaufprozessen unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von denen zur Optimierung von Satzprozessen. Es werden die zu untersuchenden experimentellen Bedingungen festgelegt (z.B. Zulaufvolumenstrom, pH, Zulaufmedien), die entsprechenden Prozesse durchgeführt und auf die zu optimierenden Zielgrößen untersucht. Auch hier können eindimensionale Suchverfahren angewandt werden, bei denen in jedem Experiment nur der Wert einer Variable (z.B. Konzentration, Volumenstrom etc.) verändert wird (Abbildung 3.12-A). Dieses experimentelle Vorgehen ist für manche Fragestellungen schnell und ausreichend, vernachlässigt aber Wechselwirkungen, die durch die Änderung von weiteren Einflussfaktoren entstehen. Aus diesem Grund ist es in vielen Fällen sinnvoll die Variation mehrerer Variablen in einer Optimierungsstrategie zusammenzufassen. Anstatt einen Einflussfaktor zu ändern und die Zielgröße zu beobachten, werden bei den statistischen faktoriellen Versuchsplänen mindestens zwei Faktoren mit mehreren Stufen verändert und dabei von linearen Zusammenhängen der Einflussfaktoren ausgegangen. Da durch diese Herangehensweise schnell sehr viele mögliche Kombinationen entstehen ( $2^m$ , mit 2 Stufen bei  $m$  Faktoren), werden für diese Fragestellungen meist Teilfaktorpläne, wie die von Plackett und Burmann (1946) verwendet. Die Kombination dieser Teilfaktorpläne mit der Methode des „steilsten Anstiegs“ kann zu dem Auffinden eines Maximums in dem Versuchsraum führen (Kennedy and Krouse, 1999; Abbildung 3.12-B). Ist der Bereich des Maximums eingegrenzt, kann in diesem durch die Nutzung eines quadratischen Polynomansatzes (Response Surface Methodology (RSM)) das lokale Optimum gesucht werden (Box und Wilson, 1951.; vgl. Kapitel 4.4)



**Abbildung 3.12: Experimentelle Optimumssuche (nach Weuster-Botz, 1999)**

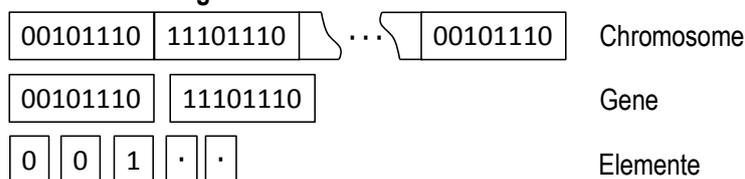
Dargestellt ist die Suche nach dem globalen Optimum ( $\blacksquare$ ) mit Hilfe von eindimensionalen Suchverfahren (A) und statistischen Suchverfahren (B und C). Das Eingrenzen erfolgt mit faktoriellen Versuchsplänen und dem „steilsten Anstieg“, wohingegen die Optimumssuche ( $\bullet$ ) mit der „Response Surface Methode“ (RSM) durchgeführt werden kann.

Trotz der Reduzierung des Aufwands durch die Teilfaktorpläne, werden bei drei zu untersuchenden Variablen immer noch 15 Experimente benötigt. Aus diesem Grund lassen sich wenige Optimierungen von Zulaufverfahren mit diesen Ansätzen finden. Zudem beschränken sich diese Experimente häufig auf Prozesse in Schüttelkolben bei denen das

Zulaufmedium nur einmalig während der Prozesszeit zugegeben wird (Chan et al., 1998). Der zeitliche Aufwand, für eine Optimierung mit RSM lässt sich anhand der Ergebnisse von Inan et al. (1999) mit einem *Pichia pastoris* Prozess erkennen. In 20 Zulaufprozessen im Rührkesselreaktor führten die Autoren eine Optimierung des pH, der Temperatur und des konstanten Glycerin-Zulaufvolumenstroms durch. Bei einer Prozesszeit von 84 h ist der zeitliche Aufwand dieser Optimierung mit einem Reaktor auf ~5 Monate abschätzbar. Durch die parallele Verwendung von drei Reaktoren konnte sie auf ~2 Monate verkürzt werden. In anderen Arbeiten wurden hingegen die Bestandteile des Zulaufmediums, bei gleichbleibender Zulauftrate, variiert (Saraswat et al., 2000; Nasri Nasrabadi und Razavi, 2010) oder der Startzeitpunkt des Zulaufs verändert (Carvalho et al., 2002). Die Verwendung von statistischen Versuchsplänen zur Optimierung von Zulaufprozessen findet also nur selten Anwendung.

Bei stochastischen Versuchsplänen, wie genetischen Algorithmen (GA), werden im Gegensatz zu den statistischen Verfahren vor allem nicht lineare Zusammenhänge untersucht. Der GA macht sich Eigenschaften der Evolution zunutze, bei der sich die stärksten Gene durchsetzen. Zur Erstellung der Gene werden die zu untersuchenden Variablen mit den verwendeten Werten in binäre Elemente kodiert oder direkt als Wert übernommen (Roubos et al., 1999, Abbildung 3.13). Aus einem Satz an Genen, der aus allen verwendeten Variablen besteht, werden Chromosomen gebildet, die als Individuen bezeichnet werden. Die erste Generation dieser Individuen wird zufällig im Rahmen des experimentellen Raums erstellt und die zugehörigen Zielgrößen experimentell bestimmt. Die besten Individuen geben nach dem Prinzip der Evolution ihre Gene weiter, wobei es durch „Mutationen“ und „Cross-over“ immer wieder zu Erneuerungen zwischen den Individuen kommt (Abbildung 3.13-B). Diese sorgen dafür, dass der Algorithmus nicht nur ein lokales, sondern das absolute Optimum des experimentellen Raums finden kann. Die Anzahl der Generationen, die zu erstellen sind, ist abhängig von dem gesetzten Abbruchkriterium.

#### A Binäre Kodierung



#### Echtwert Kodierung

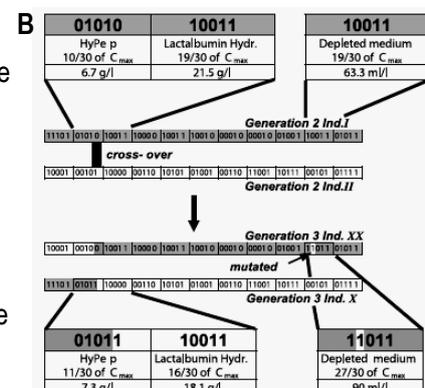
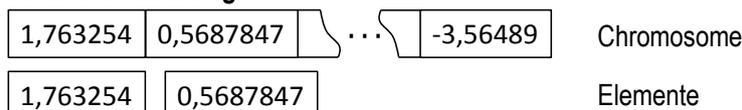


Abbildung 3.13: Aufbau der Kodierung eines Genetischen Algorithmus mit binärer und Echtwertkodierung (A, aus Roubos et al., 1999) und die Funktion von Crossover und Punktmutation während der Bildung einer neuen Generation (B, aus Marteiijn et al., 2002)

Genetische Algorithmen können für die Optimierung ähnlicher Zielgrößen verwendet werden, wie die statistischen Versuchspläne, dabei jedoch größere Variablenräume abdecken. Eine

Kombination aus GA und RSM zum Auffinden der Region des Optimums und zum anschließenden exakteren Auffinden von diesem bietet sich also an.

Da auch bei der Verwendung von GAs für die Optimierung eine hohe Anzahl an Experimenten (meist >10) pro Generation durchgeführt werden muss, ist dieser Algorithmus, im Gegensatz zur Optimierung von Satzmedien (Vester, 2009b; Etschmann et al., 2004, Havel et al., 2006), ähnlich wie die RSM wenig für Zulaufprozesse verwendet worden. Neben der Suche des besten Zulaufmediums (Marteijn et al., 2002), lassen sich auch Optimierungen des Zulaufprofils durchführen. Dies konnte von Altenbach-Rehm et al. (1999) gezeigt werden. Dabei wurde der Zulaufvolumenstrom des Induktors als eine doppel-sigmoidale Funktion mit 5 Parametern beschrieben und zusammen mit einer konstanten Zulauftrate des Substrats optimiert. Die benötigten 11 Experimente pro Generation konnten aufgrund einer Maßstabsverkleinerung in parallelen Reaktoren durchgeführt werden.

### 3.4.2 Modellbasierte Optimierung

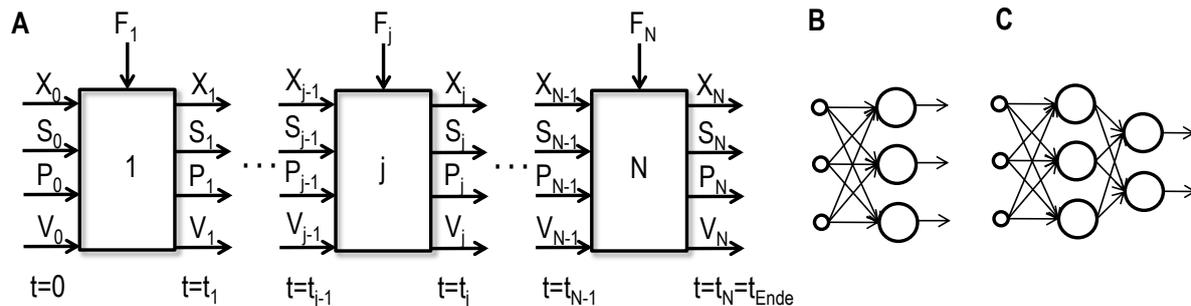
Mit modellbasierten Optimierungen soll der experimentelle Aufwand zur Optimierung von Zulaufprozessen reduziert werden. Ziel ist es dabei ein Modell des Prozesses zu haben, das durch die Festlegung der Zielgröße die zugehörigen Einflussgrößen festlegt. Steht für den Prozess kein Modell zur Verfügung, kann ein künstliches Neuronales Netzwerk (*Artificial neural network*, ANN) erstellt werden. Dieses ist ähnlich wie das Gehirn aufgebaut, indem es Eingangssignale über „Neuronen“ verknüpft und in Ausgangssignale wandelt. Da die so entwickelten Modelle nicht bekannt sind, werden diese auch als „Black-Box-Modelle“ bezeichnet. An dem folgenden Beispiel soll die Erstellung eines solchen Netzwerks verdeutlicht werden (nach Chaudhuri und Modak, 1998). Für einen Zulaufprozess mit dem Zulaufvolumenstrom  $F_{ein}$  soll am Ende des Prozesses zur Zeit  $t = t_{Ende}$  eine maximale Produktkonzentration  $P$  und Reaktorvolumen  $V$  erreicht werden (Gleichung 3.37).

$$F_{ein}(t) = (P \cdot V)_{t_{Ende}} \quad \text{Gleichung 3.39}$$

Dabei müssen die Nebenbedingungen  $V(t) \leq V_{max}$ ;  $0 \leq F_{ein}(t) \leq F_{ein,max}$  und  $0 \leq t \leq t_{Ende}$  eingehalten werden. Der Zulaufvolumenstrom muss nun zu jedem Zeitpunkt  $t$  die maximale Produktbildung mit sich bringen. Durch die Unterteilung des Prozesses in  $N$  Schritte, mit dem Zeitraum  $\Delta t_i$ , lassen sich die Einflüsse der Eingangsvariablen Zellkonzentration  $X_{j-1}$ , Substratkonzentration  $S_{j-1}$ , Produktkonzentration  $P_{j-1}$  und Reaktorvolumen  $V_{j-1}$  zum Zeitpunkt  $t_{j-1}$  auf die Ausgangsvariablen  $X_j$ ,  $S_j$ ,  $P_j$  und  $V_j$  bei  $t = t_j$  bestimmen (Abbildung 3.14). Wird dies für alle  $N$  Intervalle getan, so kann das Netzwerk Zusammenhänge erstellen, auch wenn diese dem Experimentator nicht bekannt waren. Diese Zusammenhänge werden in den versteckten Schichten erzeugt. Abhängig von dem untersuchten Prozess können innerhalb eines Intervalls  $\Delta t_j$  einige Variablen konstant gehalten werden. Die so erhaltenen Daten können genutzt werden das ANN zu trainieren und anschließend Prozesse wiederzugeben.

Die Netze können wiederum in „feedforward“-Netze, die Daten nur in eine Richtung weitergeben und rekurrente Netze unterteilt werden. Dabei können die letzteren durch eine Rückkopplung oder Zeitverzögerung das dynamische Verhalten des Netzes erhöhen.

Die Qualität des Netzes wird durch die zum Training verwendeten Daten vorgegeben. Ronen et al. (2002) zeigten, dass sich aus drei experimentell durchgeführten Zulaufprozessen mit willkürlichen Zulaufprofilen das neuronale Netzwerk bereits ausreichend trainieren ließ, um den durchgeführten Prozess anschließend zu optimieren.



**Abbildung 3.14:** Prozess in diskreten Schritten (A, aus Chaudhuri und Modak, 1998). Aufbau von neuronalen Netzen als einschichtiges *feedforward*-Netz (B) und mehrschichtiges *feedforward*-Netz mit einer versteckten Schicht (hidden layer) (C).

Zuo und Wu (2000) nutzten hingegen ein neuronales Netzwerk (NN), um die unbekanntes Variablen spezifische Wachstumsrate  $\mu$ , Substrataufnahmerate  $q_S$  und die Produktbildungsrate  $q_P$  aus den Massenbilanzen (Gleichung 3.26 - 3.28) zu erhalten. Das NN, das diese Variablen ausgab wurde mit dem Zulaufvolumenstrom  $F_{\text{ein}}$  und dessen Substratkonzentration  $c_{S,\text{ein}}$  aus vier Experimenten gespeist, um das Netzwerk zu trainieren.

Bei anderen Optimierungsproblemen liegen bereits gute deterministische Modelle vor, die den Zulaufprozess beschreiben. Dabei treten vor allem drei Modelle immer wieder auf, bei denen mit Hilfe von genetischen Algorithmen (GA) (vgl. Kapitel 3.4.1) oder anderen Strategien die Zulaufvolumenströme optimiert wurden. Dies ist die Produktion von sekretiertem Protein durch *E. coli* (Park und Ramirez, 1988; Chaudhuri und Modak, 1998, Sarkar und Modak, 2003), die Hefeproduktion auf Glukose und Ethanol als Substrat (Pertev et al., 1997; Berber et al., 1998; Bošković und Narendra, 1995, Cabrera et al., 2002; Sarkar und Modak, 2003; Na et al., 2002) und die Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen (de Tremblay et al., 1992; Roubos et al., 1999; Chen und Nguang, 2002). Durch die modellbasierte Optimierung können die Zulaufprozesse in hunderten oder auch mehreren zehntausenden (Roubos et al., 1999) von Generationen optimiert werden. Auch die zu optimierenden Zulaufvolumenströme können über die Prozesszeit in beliebig viele Intervalle unterteilt werden, um glatte Kurven zu erhalten. Soweit die Prozesse experimentell validiert wurden, konnten sie die theoretischen Ergebnisse bestätigen (Zuo und Wu, 2000; Ronen et al., 2002; Cabrera et al., 2002).

Neben der Optimierung von Zulaufvolumenströmen lassen sich, vor allem durch die Verwendung der neuronalen Netze, auch weitere Messgrößen, wie der Sauerstoffpartialdruck

( $pO_2$ ), pH, Temperatur, die Zugabe von Titrationsmittel,  $CO_2$ - und  $O_2$ -Konzentration im Abgas und die Rührerdrehzahl als Eingangsgrößen für die Optimierung verwenden. Neben diesen direkt gemessenen Variablen können auch berechnete Werte, wie der RQ oder die OUR verwendet werden (Gnoth et al., 2008). Für deren Nutzung ist neben der Verlässlichkeit der Eingangsgrößen, deren Verarbeitung wichtig. Diese als Software-Sensoren (Soft-Sensor) benannten Berechnungen werden meist durch die beschriebenen Neuronalen Netzwerke oder durch (erweiterte) Kalmanfilter durchgeführt (Kalman, 1960). Die Regelung kann als offener Regelkreis geschehen, wenn gemessene Variablen nicht verfügbar oder unzuverlässig sind. Dagegen greift der geschlossene Regelkreis die Variablen aus dem laufenden Prozess ab, um die Regelung zu aktualisieren (Gnoth et al., 2008).

Einflussgrößen, die „online“ während eines Prozesses gemessen werden können, können direkt in einem Modell verwendet und der laufende Prozess online optimiert werden. Die resultierenden Steuergrößen können wiederum in den Prozess eingreifen und diesen in optimierter Form weiterführen (Frahm et al., 2004). Hierdurch können neben der Zellkonzentration auch andere Regelgrößen gesteuert werden.

Ein Regelkreis ohne Optimierung wurde von Kleist et al. (2002) eingeführt. Dabei konnte zum einen durch die at-line gemessene Glukosekonzentration, zum anderen durch den gemessenen  $pO_2$  der Zulaufvolumenstrom so eingestellt werden, dass die gewünschten Konzentrationen an Glukose beziehungsweise  $pO_2$  gehalten wurden.

Na et al. (2002) zeigten, dass die Anpassung der Zulauftrate an die aktuelle Wachstumsrate mit einem einfachen Modell möglich ist. Hierbei wurde während des Prozesses zu jeder Stunde die Wachstumsrate gemessen und mit Hilfe eines GAs der optimale Zulaufvolumenstrom für den weiteren Prozessverlauf bestimmt. In einer weiteren Semi-Echtzeit Optimierung wurde der aus einem Modell berechnete Zulaufvolumenstrom mit dem tatsächlichen abgeglichen (Zuo und Wu, 2000). Die Abweichungen flossen erneut in das Modell ein und verbesserten durch eine Korrektur des Zulaufvolumenstroms die finale Produktkonzentration.

Eine modellbasierte Optimierung kann also die Anzahl der benötigten Experimente stark reduzieren. Weiterhin kann durch eine online Optimierung, die die Steuerung des Prozesses übernimmt die Varianz zwischen den sequentiellen Prozessen verringert werden (Gnoth et al., 2008).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Lösungen und Medien

Für die Durchführung von Kultivierungen und Analytik wurden verschiedene Lösungen und Medien benötigt. Die Erstellung und Zusammensetzung ist in diesem Kapitel beschrieben. Dabei ist das Kapitel zum einen in die Arbeiten mit *Bacillus subtilis* zur Riboflavinproduktion und zum anderen in die Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen mit *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 und *Trichoderma reesei* RUT-C30 unterteilt.

#### 4.1.1 Riboflavinproduktion

Im Folgenden sind Lösungen und Medien aufgeführt, die für die Riboflavinproduktion mit *B. subtilis* verwendet wurden oder der Analytik der Prozesse dienen.

##### 4.1.1.1 Stammlösungen

Bei der Erstellung der Stammlösungen wurden die Chemikalien eingewogen, mit VE-H<sub>2</sub>O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Ausgenommen waren die Eisensulfat-Lösung, die steril filtriert wurde (0,2 µm), und die Chloramphenicol-Lösung, die in reinem Ethanol angesetzt und direkt verwendet wurde. Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Lösungen wurden für das Ansetzen der Medien verwendet. Für die Durchführung von Optimierungsexperimenten zum Zulaufmedium, wurden weitere Stammlösungen erstellt (Tabelle 4.2), die teilweise in variierenden Mengen in den Satzmedien eingesetzt wurden (Vester, 2009b).

Tabelle 4.1: Stammlösungen der Medienzusätze zur Riboflavinproduktion

Komponente	Lösungsmittel	Konzentration	Sterilisation
<b>Antischaum (1:2)</b>	VE-H <sub>2</sub> O		AK
Struktol J633		500 mL L <sup>-1</sup>	
<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung (500x)</b>	VE-H <sub>2</sub> O		AK
CaCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O		31,25 g L <sup>-1</sup>	
<b>Chloramphenicol-Lösung (500x)</b>	Ethanol (absolut)		SF
Chloramphenicol		30,0 g L <sup>-1</sup>	
<b>Eisensulfat-Lösung (500x)</b>	VE-H <sub>2</sub> O		AK
FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O		21,0 g L <sup>-1</sup>	
<b>Mg/Zn-Lösung (500x)</b>	VE-H <sub>2</sub> O		AK
MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O		500 g L <sup>-1</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O		2,0 g L <sup>-1</sup>	
<b>Spurenelemente (500x)</b>	VE-H <sub>2</sub> O		AK
AlCl <sub>3</sub> •6 H <sub>2</sub> O		0,5 g L <sup>-1</sup>	
CoCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O		2,0 g L <sup>-1</sup>	
CuCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O		0,375 g L <sup>-1</sup>	
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O		7,0 g L <sup>-1</sup>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>		0,75 g L <sup>-1</sup>	

Tabelle 4.2: Stammlösungen zur Erstellung von Satzmedien für die Riboflavinproduktion

Komponente	Konzentration
<b>Glukose</b>	
Glukose•H <sub>2</sub> O	682,5 g L <sup>-1</sup>
<b>A1</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12 H <sub>2</sub> O	164,6 g L <sup>-1</sup>
<b>A2</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28,2 g L <sup>-1</sup>
Na-Glutamat•H <sub>2</sub> O	16,6 g L <sup>-1</sup>
<b>Puffer-Lösung (8x)</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	192,0 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei)	192,0 g L <sup>-1</sup>
<b>Glycin-Lösung (20x)</b>	
Glycin	40,0 g L <sup>-1</sup>
<b>NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (5x)</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	120,0 g L <sup>-1</sup>
<b>Hefeextrakt-Lösung (5x)</b>	
Hefeextrakt	300,0 g L <sup>-1</sup>
<b>Casamino Acids-Lösung (5x)</b>	
Casamino Acids	300,0 g L <sup>-1</sup>
<b>Eisensulfat-Lösung (25x)</b>	
FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	5,0 g L <sup>-1</sup>
<b>NaNO<sub>3</sub>-Lösung (15x)</b>	
NaNO <sub>3</sub>	360,0 g L <sup>-1</sup>

#### 4.1.1.2 Vorkultur

Für die Kultivierung im Milliliter- und im Litermaßstab wurde eine zweistufige Vorkultur nach folgendem Protokoll erstellt:

In einen 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen wurden 50 mL des autoklavierten Vorkulturmediums I vorgelegt (Tabelle 4.1). Nach der Zugabe von 100 µL Chloramphenicol und 3 Tropfen sterilem Antischaum wurde der Ansatz mit 1 mL einer Bakterienstammlösung inokuliert.

**Tabelle 4.3: Vorkulturmedium I zur Riboflavinproduktion**

Komponente	Konzentration
Veal Infusion Broth	30,0 g L <sup>-1</sup>
Sorbitol	10,0 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5,0 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	2,5 g L <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	0,06 g L <sup>-1</sup>
Struktol J633 1:2	0,2 mL L <sup>-1</sup>
Lösungsmittel VE-H <sub>2</sub> O	ad 1,0 L

Für die zweite Vorkultur wurden 150 mL autoklaviertes Vorkulturmedium II in einen 1 L Schüttelkolben mit Schikanen gefüllt. Es wurden weiterhin jeweils 300 µL Zusätze (Spurenelement-, Mg/Zn-Lösung, Chloramphenicol und Eisensulfat, siehe Tabelle 4.1) hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit 10 Tropfen Struktol J633 (1:2) versetzt und mit 500 µL verdünnter Vorkultur I inokuliert.

**Tabelle 4.4: Vorkulturmedium II zur Riboflavinproduktion**

Komponente	Konzentration
Na-Glutamat•H <sub>2</sub> O	0,6 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	4,0 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei)	4,0 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12 H <sub>2</sub> O	7,0 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	15,0 g L <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	0,06 g L <sup>-1</sup>
Struktol J633 (1:2)	0,2 mL L <sup>-1</sup>
Lösungsmittel VE-H <sub>2</sub> O	ad 1,0 L

#### 4.1.1.3 Satzmedien

##### Referenzmedium

Zur Erstellung des Referenzmediums wurden die in Tabelle 4.5 aufgeführten Chemikalien eingewogen, auf 0,92 L Volumen mit VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden 20,0 mL L<sup>-1</sup> der Satzglukose (Tabelle 4.2), 0,2 mL L<sup>-1</sup> Antischaum und jeweils 2,0 mL L<sup>-1</sup> der Zusätze (Spurenelemente-, Chloramphenicol-, CaCl<sub>2</sub>-, Mg/Zn- und

Eisensulfat-Lösung, siehe Tabelle 4.1) unter sterilen Bedingungen dem Medium zugegeben. Die Inokulation der Hauptkultur mit der Vorkultur II erfolgte bei  $OD_{650nm} = 6 - 8$  mit einem Volumen von  $50 \text{ mL L}^{-1}$ .

**Tabelle 4.5: Referenzmedium zur Riboflavinproduktion**

Komponente	Konzentration
Na-Glutamat•H <sub>2</sub> O	0,75 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	4,71 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei)	4,71 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12 H <sub>2</sub> O	8,23 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0,23 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,41 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	11,77 g L <sup>-1</sup>
Lösungsmittel VE-H <sub>2</sub> O	ad 0,92 L

### Satzmedien aus der Optimierung

Die Satzmedien aus der Optimierung II von Vester (2009b) wurden aus autoklavierten Stammlösungen (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2) angesetzt. Die Lösungen wurden nach dem folgenden Schema steril aus den Stammlösungen auf die benötigten Endvolumina zusammengegeben. Die Inokulation der Hauptkultur mit der Vorkultur II erfolgt bei  $OD_{650nm} = 6 - 8$  mit einem Volumen von  $50 \text{ mL L}^{-1}$ :

**Tabelle 4.6: Schema zum Ansetzen von weiteren Satzmedien zur Riboflavinproduktion**

Lösung	Gen2Ind6	Gen4Ind10	Gen8Ind14
Puffer-Lösung (8x)	101,0 mL L <sup>-1</sup>	61,1 mL L <sup>-1</sup>	37,2 mL L <sup>-1</sup>
Glycin-Lösung (20x)	17,5 mL L <sup>-1</sup>	24,0 mL L <sup>-1</sup>	20,8 mL L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl-Lösung (5x)	0,8 mL L <sup>-1</sup>	14,1 mL L <sup>-1</sup>	0,8 mL L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt-Lösung (5x)	32,4 mL L <sup>-1</sup>	45,3 mL L <sup>-1</sup>	135,6 mL L <sup>-1</sup>
Casamino Acids-Lösung (5x)	147,0 mL L <sup>-1</sup>	94,0 mL L <sup>-1</sup>	14,6 mL L <sup>-1</sup>
Eisensulfat-Lösung (25x)	8,2 mL L <sup>-1</sup>	2,9 mL L <sup>-1</sup>	8,2 mL L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub> -Lösung (15x)	9,1 mL L <sup>-1</sup>	53,4 mL L <sup>-1</sup>	9,1 mL L <sup>-1</sup>
<i>Mit sterilem VE-H<sub>2</sub>O auf 820 mL auffüllen</i>			
A1		50,0 mL L <sup>-1</sup>	
A2		50,0 mL L <sup>-1</sup>	
Satzglukose		20,0 mL L <sup>-1</sup>	
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (500x)		2,0 mL L <sup>-1</sup>	
Chloramphenicol-Lösung (500x)		2,0 mL L <sup>-1</sup>	
Eisensulfat-Lösung (500x)		2,0 mL L <sup>-1</sup>	
Mg/Zn-Lösung (500x)		2,0 mL L <sup>-1</sup>	
Spurenelemente (500x)		2,0 mL L <sup>-1</sup>	
Antischaum		0,6 mL L <sup>-1</sup>	
Inokulum		50,0 mL L <sup>-1</sup>	

#### 4.1.1.4 Zulauflösung

Zum Erstellen der Zulauflösung wurden eine Glukose-, eine Mineral- und eine Ammoniumsulfatlösung mit VE-H<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert. Die Konzentrationen sind in Tabelle 4.7 aufgelistet. Die Zulaufraten an Glukose betragen 6,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> für die Kultivierungen mit Ammoniak als Base und 5,1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> für die übrigen Kultivierungen.

Für den Litermaßstab wurden 28,69 mL L<sup>-1</sup> Minerallösung und entsprechend der gewünschten Konzentration die Ammoniumsulfatlösung (Tabelle 4.8) zur Glukose gegeben und diese auf 1 L mit sterilem VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dies ergab eine Konzentration von 455 g L<sup>-1</sup> Glukose in der Zulauflösung.

Im Millilitermaßstab wurden 25 mL L<sup>-1</sup> Minerallösung zu der autoklavierten Glukoselösung gegeben und die Lösung auf 1 L Volumen aufgefüllt. Zur Erstellung der fertigen Zulauflösung wurde die resultierende Glukoselösung mit der entsprechenden Menge an Ammoniumsulfatlösung (Tabelle 4.8) und sterilem VE-H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1:2 verdünnt, so dass die Lösung eine Konzentration von 198 g L<sup>-1</sup> Glukose enthielt.

**Tabelle 4.7: Stammlösungen zum Ansetzen der Zulaufösungen zur Riboflavinproduktion**

Komponente	Konzentration
<b>Minerallösung</b>	
MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	40,0 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,292 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	0,08 g L <sup>-1</sup>
<b>Litermaßstab</b>	
<b>Glukose</b>	
Glukose•H <sub>2</sub> O	500,0 g L <sup>-1</sup>
VE-H <sub>2</sub> O	300,0 mL L <sup>-1</sup>
<b>Ammoniumsulfatlösung</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	450,0 g L <sup>-1</sup>
<b>Millilitermaßstab</b>	
<b>Glukose</b>	
Glukose•H <sub>2</sub> O	436,7 g L <sup>-1</sup>
VE-H <sub>2</sub> O	300,0 mL L <sup>-1</sup>
<b>Ammoniumsulfatlösung</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	300,0 g L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.8: Stickstoffkonzentrationen in Zulaufmedien zur Riboflavinproduktion**

Stickstoffzulauftrate	Medium	Litermaßstab	Millilitermaßstab
1,55 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Alle	137,58 g L <sup>-1</sup>	60,0 g L <sup>-1</sup>
0,84 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referenz	75,04 g L <sup>-1</sup>	32,7 g L <sup>-1</sup>
0,77 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Gen8 Ind14	68,5 g L <sup>-1</sup>	29,9 g L <sup>-1</sup>
0,76 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Gen4 Ind10	67,3 g L <sup>-1</sup>	29,4 g L <sup>-1</sup>
0,4 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Gen2 Ind6	35,5 g L <sup>-1</sup>	15,5 g L <sup>-1</sup>

#### 4.1.1.5 Korrekturmittel für Kultivierungen

Für die einseitige pH-Regelung der Kultivierungen mit *B. subtilis* auf pH 6,8 wurden zwei verschiedene Basen eingesetzt. Zum einen wurde aus einer 25 % Ammoniumhydroxidlösung mit VE-H<sub>2</sub>O eine 12,5 %ige Lösung durch eine 1:2 Mischung erstellt. Diese Base diente gleichzeitig auch als Stickstoffquelle für den Prozess. Zum anderen wurde 4 M Natronlauge zur Korrektur eingesetzt, wobei der Stickstoff in diesen Prozessen über das Zulaufmedium dem Prozess zugeführt wurde.

#### 4.1.1.6 Lösungen zur Probenaufbereitung

##### Natronlauge

Für die Aufarbeitung der Proben zur Riboflavinanalytik wurden die Riboflavinkristalle in 1 M Natronlauge gelöst. Zur Erstellung der Lösung wurde eine 10 M Natronlauge angesetzt, indem 40,0 g Natriumhydroxid auf Eis in 100 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst wurden. Aus dieser Stammlösung wurde durch eine 1:10 Verdünnung die gebrauchsfertige 1 M Natronlauge erstellt.

##### Pufferlösung

Für das Messen der Zelldichten und der Riboflavinkonzentrationen in den Kultivierungen mussten die Proben auf Konzentrationen verdünnt werden, die im Messbereich lagen. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit Hilfe eines 0,1 M Natriumphosphatpuffers.

Zur Erstellung der 0,1 M Pufferlösung mit pH = 7,4 wurden 11,385 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,732 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O eingewogen. Die Chemikalien wurden auf 1 L mit VE-H<sub>2</sub>O gelöst und aufgefüllt.

##### Zitronensäure

Bei der Aufarbeitung der Riboflavinproben wurde die Natronlauge durch Zugabe von 1,5 M Zitronensäure neutralisiert. Zum Ansetzen der 1,5 M Zitronensäure wurden 31,521 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>•H<sub>2</sub>O eingewogen und auf ein Gesamtvolumen von 100 mL mit VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

## 4.1.2 Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen

### 4.1.2.1 Kulturmedien

#### Satzmedien

Für die Produktion von Cellulasen und Hemicellulasen werden hauptsächlich zwei Medien in verschiedenen Variationen verwendet. Zum einen ist dies das Medium nach Vogel (1956), das meist als „Vogel-Medium“ bezeichnet wird, und das „Mandels-Medium“, das von Mandels und Weber (1969) entwickelt wurde. Bei der Verwendung dieser Medien werden zumeist Stammlösungen angesetzt und diese mit Leitungswasser zum fertigen Medium verdünnt. Bei der Sterilisation der Medien durch Autoklavieren wird das Medium für 20 min auf 121 °C erhitzt. Zur Erstellung der Medien wurden die in Tabelle 4.9 aufgelisteten Lösungen verwendet.

**Tabelle 4.9: Stammlösung zur Erstellung von Medien für die Hemicellulase und Cellulaseproduktion**

Lösung	Konzentration
<b>Laktoselösung (150 g L<sup>-1</sup>)</b>	
Laktose Monohydrat	157,98 g L <sup>-1</sup>
<b>Biotinlösung (1 g L<sup>-1</sup>)</b>	
Biotin	1 g L <sup>-1</sup> in 50 % (v/v) Ethanol
<b>1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09 g L <sup>-1</sup>
<b>1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18 g L <sup>-1</sup>
<b>10 % Glycerin/0,1 % Triton-Lösung</b>	
98 % Glycerin	100 mL L <sup>-1</sup>
10 % Triton X100	10 mL L <sup>-1</sup>

Die in Tabelle 4.10 aufgelistete Spurenelementlösung wurde zur Erstellung der Vogels-Lösung in Tabelle 4.11 erstellt. Mit der Vogels-Lösung wurde das Satzmedium (Tabelle 4.12) für Vorkulturen und die Experimente in Schüttelkolben, Milliliter- und Litermaßstab mit *A. aculeatus* DSM 2344 erstellt. Für die Experimente zu verschiedenen Zuckern wurden Laktose Monohydrat, Glukose Monohydrat und Maltose Monohydrat auf eine finale Zuckerkonzentration von 1 % direkt in das Medium vor dem Autoklavieren eingewogen.

**Tabelle 4.10: 1000x Spurenelementlösung für das Vogel-Medium**

Die angegebenen Konzentrationen werden in VE-H<sub>2</sub>O angesetzt.

Substrat	Konzentration
Zitronensäure Monohydrat	5,0 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	5,0 g L <sup>-1</sup>
Fe(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1,0 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05 g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,05 g L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.11: 50x Vogels-Lösung zur Erstellung des Vogels-Medium**

Die angegebenen Konzentrationen wurden in VE-H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist in Tabelle 4.10 beschrieben.

Substrat	Konzentration
Natriumcitrat Pentahydrat	150 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	10 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	5 mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.12: Zusammensetzung des Vogels-Medium, zur Kultivierung von *A. aculeatus* DSM 2344**

Komponente	Vorkultur	Fermenter
50x Vogels Lösung	20 mL L <sup>-1</sup>	20 mL L <sup>-1</sup>
Xylan	20 g L <sup>-1</sup>	20 g L <sup>-1</sup>
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,53 mL L <sup>-1</sup>	0,53 mL L <sup>-1</sup>
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48,93 mL L <sup>-1</sup>	48,93 mL L <sup>-1</sup>
Leitungswasser	auf 0,912 L auffüllen	auf 0,812 L auffüllen
	<i>autoklavieren</i>	
Laktose-Lsg. (150 g L <sup>-1</sup> )	66,67 mL L <sup>-1</sup>	66,67 mL L <sup>-1</sup>
1 g/L Biotin (sterilfiltriert)	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>
Inokulum	Sporensuspension	100 mL L <sup>-1</sup> Vorkultur

Für die Kultivierungen mit *T. reesei* RUT-C30 zur Cellulaseproduktion wurde das Mandels-Medium verwendet. Für dieses wurde ebenfalls mit einer Spurenelementlösung (Tabelle 4.13) eine Stammlösung der Salze erstellt (Tabelle 4.14). Die Erstellung des Kulturmediums inklusive des Puffers, der für die Optimierungsexperimente benutzt wurde, sind in Tabelle 4.15 dargestellt. Die eingewogenen Konzentrationen an Zitronensäure und Natriumcitrat ergeben einen 0,1 M Puffer. Für Experimente zum Einfluss des Puffer-pHs, wurden die Konzentrationen des Puffers auf pH 4,0 und pH 5,0 zu 11,994 bzw. 7,034 g L<sup>-1</sup> Zitronensäure und 11,051 bzw. 18,643 g L<sup>-1</sup> Tri-Natriumcitrat Dihydrat geändert.

**Tabelle 4.13: 2000x Spurenelementlösung für das Mandels-Medium**

Die angegebenen Konzentrationen werden in VE-H<sub>2</sub>O angesetzt.

Substrat	Konzentration
FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,12 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	2,8 g L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub>	4 g L <sup>-1</sup>
HCl	5 mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.14: 25x Mandels-Lösung zur Erstellung des Mandels-Medium.**

Die angegebenen Konzentrationen wurden in VE-H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist in Tabelle 4.13 beschrieben.

Substrat	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	7,5 g L <sup>-1</sup>
Urea	7,5 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> *	7,5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelemente (2000x)	12,5 mL L <sup>-1</sup>

\* Wurde vor der Zugabe in VE-H<sub>2</sub>O gelöst

**Tabelle 4.15: Zusammensetzung des Mandels-Medium zur Kultivierung von *T. reesei* RUT-C30**

Komponente	Vorkultur	Experiment
25x Mandels-Lösung	40 mL L <sup>-1</sup>	40 mL L <sup>-1</sup>
Cellulose (Avicel PH-101)	20 g L <sup>-1</sup>	Nach Experiment
Zitronensäure (wasserfrei)	9,554 g L <sup>-1</sup>	9,554 g L <sup>-1</sup>
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	14,786 g L <sup>-1</sup>	14,786 g L <sup>-1</sup>
Tween 80	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>
Pepton aus Casein	5 g L <sup>-1</sup>	5 g L <sup>-1</sup>
Leitungswasser	auf 0,912 L auffüllen	auf 0,812 L auffüllen
		<i>autoklavieren</i>
Laktose-Lsg. (150 g L <sup>-1</sup> )	66,67 mL L <sup>-1</sup>	66,67 mL L <sup>-1</sup>
Inokulum	Sporenlösung	100 mL L <sup>-1</sup> Vorkultur

### Zulaufmedien

Für die Optimierung der Zulaufmedien wurden die Medien analog zu den experimentellen Versuchsplänen erstellt (Tabelle 4.23). Für die Kultivierungen mit *A. aculeatus* DSM 2344 wurde dafür das Xylan zusammen mit dem Laktose-Monohydrat in ein 15 mL Reaktionsgefäß eingewogen, das Ammoniumnitrat aus einer 10x Stammlösung (285,7 g L<sup>-1</sup> in VE-H<sub>2</sub>O) hinzugegeben und alles mit VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Autoklavieren auf das entsprechende Volumen mit sterilem VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Für die Optimierungen mit *T. reesei* RUT-C30 wurden die Zulaufmedien nach dem in Tabelle 4.23 dargestellten Plan erstellt. Dabei wurde Laktosemonohydrat eingewogen, VE-H<sub>2</sub>O hinzugegeben und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde Ammoniumsulfat aus einer sterilen 500 g L<sup>-1</sup> Lösung hinzugegeben und auf das Endvolumen mit sterilem VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für Zulaufmedien mit nur einem Substrat wurden die entsprechenden Volumina direkt eingewogen, autoklaviert und auf das Endvolumen aufgefüllt.

#### 4.1.2.2 Antischaumlösung

Die starke Schaumbildung, die vor allem bei komplexen Feststoffmedien in Rührkesselreaktoren entsteht, kann besonders bei diesen Substraten zu Problemen führen. Durch den Schaum wird das Substrat aus dem Medium ausgetragen und bildet an den

Wänden und Einbauten Ränder. Das so aus dem Kulturmedium entfernte Substrat ist in der Regel nicht wieder zuführbar. Diesem Phänomen kann durch regelmäßige Zufuhr von Antischaum, besonders während der Satzphase, entgegengewirkt werden. Als Antischaum wurde das wasserlösliche Struktol<sup>®</sup> J633 mit VE-H<sub>2</sub>O in einem Verhältnis 1:2 verdünnt.

#### 4.1.2.3 Dinitrosalicylsäure

Die Dinitrosalicylsäurelösung (DNS) wird zur Bestimmung von Zuckeräquivalenten in Lösungen verwendet und kann hierdurch die entstehenden reduzierenden Zuckerreste im Filterpapiertest und dem Xylanasetest sichtbar zu machen. Durch eine Reduzierung der 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure durch die reduzierenden Zuckerenden kommt es zu einem Farbumschlag von gelb zu rot, der bei 540 nm messbar ist. Die Zusammensetzung wurde von Sumner und Graham (1921) und Sumner und Somers (1949) als erstes beschrieben und existiert in verschiedenen Variationen. Am häufigsten wird das nach Miller (1959) und Miller et al. (1969) beschriebene Rezept verwendet. Die meisten Rezepte enthalten Phenol, um eine Verstärkung des Farbumschlags zu realisieren. Das hier verwendete Rezept verzichtet aufgrund der Verwendung von offenen Gefäßen darauf.

Bei der Herstellung der DNS-Lösung werden 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure in 500 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Unter ständigem Rühren werden 16 g NaOH hinzugegeben, wobei die Lösung auf 45 °C erwärmt werden kann, um das Lösen zu erleichtern. Nach dem Lösen werden 300 g Rochelle-Salz (Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrate) zu der Lösung hinzugegeben. Die Lösung wird im Dunkeln gerührt, bis alles gelöst ist, und auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wird der Ansatz auf 1 L mit VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und in einer lichtdichten Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lösung besitzt eine Haltbarkeit von sechs Wochen.

#### 4.1.2.4 Natriumcarbonatlösung

Bei *p*-Nitrophenyl (pNP)-basierten Enzymtests wird das Substrat gespalten, so dass *p*-Nitrophenol freigesetzt wird. Zum Abbrechen des Enzymtests und zur Verschiebung des Farbspektrums der Lösung von *p*-Nitrophenol wird eine 1 M Natriumcarbonatlösung verwendet. Diese verschiebt den pH des Ansatzes in einen basischen Bereich, wodurch ein Farbumschlag von einer farblosen zu einer gelben Lösung entsteht, die bei OD = 406 nm gemessen werden kann. Zum Ansetzen der Lösung wurden 105,99 g Natriumcarbonat in VE-H<sub>2</sub>O gelöst, auf 1,0 L aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### 4.1.2.5 Puffer

Für weitere Untersuchungen der Enzyme wurden zwei Puffer zur Durchführung der Enzymtests hergestellt. Die Aktivitätstests der Xylanasen wurden in einem 50 mM Natrium-

Citratpuffer pH 5,3 und die Cellulasetests in einem 50 mM Natrium-Citratpuffer pH 4,8 durchgeführt, wie sie in Tabelle 4.16 aufgelistet sind.

**Tabelle 4.16: Natriumcitrat-Puffer für Enzymtests**

Puffer	Citronensäure	Tri-Natriumcitrat Dihydrat
50 mM, pH 4,8	4,013 g L <sup>-1</sup>	8,562 g L <sup>-1</sup>
50 mM, pH 5,3	2,792 g L <sup>-1</sup>	10,432 g L <sup>-1</sup>

#### 4.1.2.6 *p*-Nitrophenyl-Substrate

Für die Durchführung der *p*-Nitrophenyl-Tests (*p*NP-Tests) wurden verschiedene Substrate zu einer 2 mM Lösung in dem entsprechendem Puffer hergestellt. Für die Bestimmung von Hemicellulasen wurden 27,1 mg 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside (*p*NPX) und 30,125 mg 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (*p*NPGal) in jeweils 50 mL 50 mM Natrium-Citratpuffer pH 5,3 angesetzt (Tabelle 4.16). Für die Untersuchungen der Cellulasen wurden 46,3 mg 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Cellobioside (*p*NPC) und 30,2 mg von 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (*p*NPGLu) jeweils in 50 mL 50 mM Natrium-Citratpuffer pH 4,8 (Tabelle 4.16) gelöst. Die Lösungen wurden zu 1,8 mL in 2 mL Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -32 °C aufbewahrt.

#### 4.1.2.7 Xylanase-Lösung

Für die Durchführung des Xylanasetests wurde eine 1 % Birkenxylan Lösung verwendet. Für die Herstellung der Lösung wurden 1 g Birkenxylan (4-O-Methyl Glucuronoxylan) in 80 mL eines 50 mM Natrium-Citrat Puffers pH 5,3 gegeben. Die Lösung wurde erst unter Rühren auf 60 °C erwärmt und dann für einige Minuten gekocht. Unter Rühren wurde die Lösung über Nacht abgekühlt und anschließend auf 100 mL mit dem Puffer aufgefüllt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -32 °C aufbewahrt.

## 4.2 Mikrobiologische Methoden

In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Mikroorganismen, deren Stammhaltung und Kultivierung beschrieben. Dabei wird zuerst die Riboflavinproduktion betrachtet und anschließend die Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen.

### 4.2.1 Riboflavinproduktion

Die biotechnologische Produktion von Riboflavin wurde mit dem im Folgenden beschriebenen Organismus und Protokollen sowohl im Millilitermaßstab als auch im Litermaßstab durchgeführt.

#### 4.2.1.1 Mikroorganismus und Stammhaltung

Für die Produktion von Riboflavin wurde *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> (Perkins, 1999) von DSM Nutritional Products (DSM NP) zur Verfügung gestellt. Dieser geht auf den Stamm *Bacillus subtilis* RB50 zurück, der Resistenzen gegenüber einigen Purin- und Riboflavin-Analoga besitzt, die für die Riboflavinsynthese benötigt werden. Zudem kann der Stamm nicht mehr sporulieren. In der Weiterentwicklung zu *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> wurden dem Stamm einige Gene mit starkem Promoter für die Riboflavinproduktion in das Genom mehrfach integriert und mit einer Chloramphenicolresistenz ausgestattet (Kapitel 3.1.2).

Für die Stammhaltung wurde eine Kultur mit 50 mL Vorkulturmedium I (Tabelle 4.3) in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen mit 1 mL einer Bakterienstammlösung inokuliert. Die Kultur wurde 5 – 6 h bei 37 °C und 190 min<sup>-1</sup> in einem Schüttelinkubator (Multitron II, Infors, Bottmingen, Schweiz; Exzentrizität 5 cm) kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt, mit 87 % Glycerin zu einer finalen Konzentration von 15 % (v/v) Glycerin verdünnt und jeweils 1 mL in 1,5 mL „Safe-Lock“-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Reaktionsgefäße wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.1.2 Vorkultur

Die Vorkultur für die Riboflavinproduktion mit *B. subtilis* RB50::[PRF69]<sub>n</sub> wurde in einem zweistufigen Prozess erstellt. Dabei wurde die Vorkultur I mit 50 mL Kulturmedium in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen angesetzt (Tabelle 4.3), mit 1 mL einer Bakterienstammlösung inokuliert und für fünf bis sechs Stunden bei 190 min<sup>-1</sup> und bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (Multitron II, Infors, Bottmingen, Schweiz; Exzentrizität 5 cm) kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>650nm</sub> = 0,8 - 1 wurde mit sterilem Vorkulturmedium I eine Verdünnung von 10<sup>-3</sup> – 10<sup>-5</sup> erstellt. Mit 0,5 mL dieser Verdünnung wurde die zweite Vorkultur mit 150 mL Vorkulturmedium II (Tabelle 4.4) in einem 1 L Schüttelkolben mit Schikanen inokuliert und über Nacht für ~14 h unter den gleichen Bedingungen bis OD = 6 - 8 kultiviert.

#### 4.2.1.3 Kultivierungen

Kultivierungen von *B. subtilis* zur Riboflavinproduktion wurden im Milliliter- und im Litermaßstab durchgeführt. Die Prozessführung wurde, soweit möglich, zwischen den Maßstäben übertragen. Unterschiede waren vor allem die verfahrenstechnische Realisierung eines ausreichenden Sauerstoffpartialdrucks. Hierfür wurde im Millilitermaßstab reiner Sauerstoff bis 50 % des Gasvolumenstroms in die Zuluft gemischt. Im Litermaßstab wurde hingegen Überdruck auf das Gefäß gegeben und die Rührerdrehzahl angepasst.

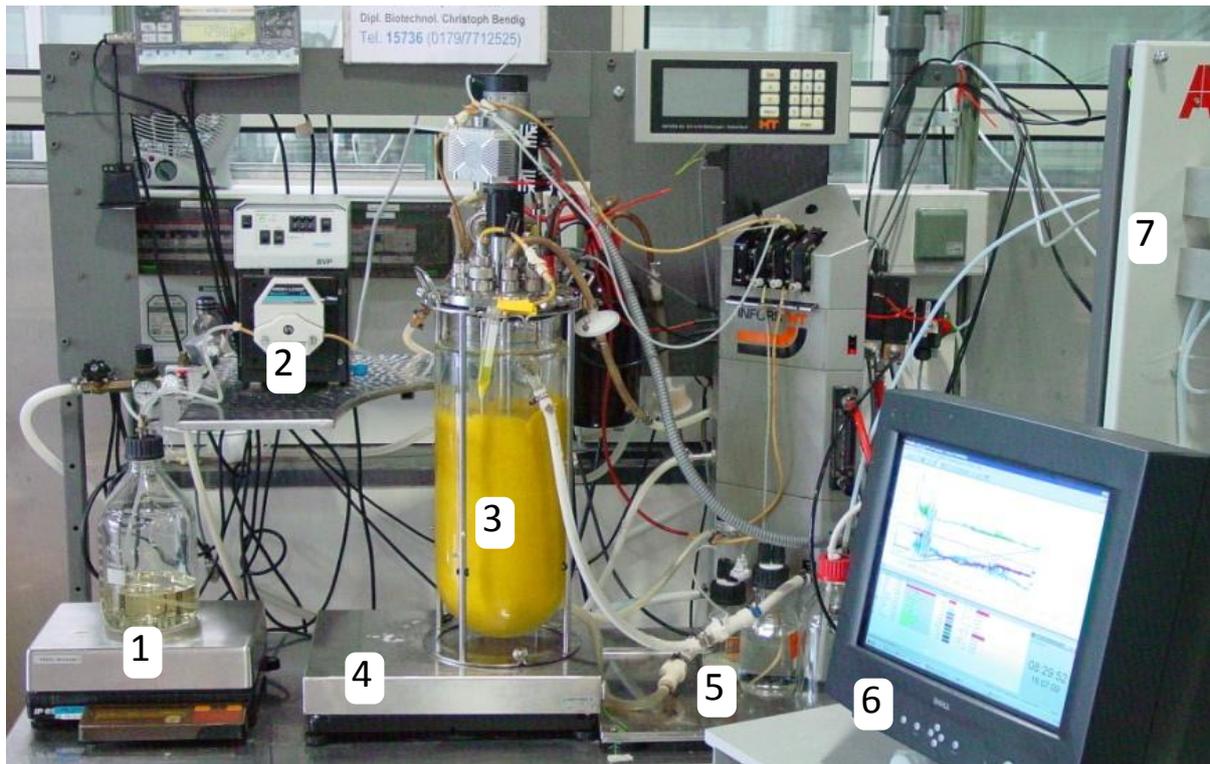
**Tabelle 4.17: Prozessparameter für Kultivierungen zur Herstellung von Riboflavin**

Parameter	Millilitermaßstab	Litermaßstab
Inokulationsvolumen	50 mL L <sup>-1</sup>	50 mL L <sup>-1</sup>
Temperatur	39 °C	39 °C
Rührerdrehzahl	2700 min <sup>-1</sup>	800-1500 min <sup>-1</sup>
(volumetrischer Leistungseintrag)	(15,3 W L <sup>-1</sup> )	(5,5-35,9 W L <sup>-1</sup> )
Überdruck		0,2 - 0,6 bar
Begasungsrate	4,8 L min <sup>-1</sup> (in alle Reaktoren)	1,17-2 vvm
Begasungsrate Sauerstoff	0,0 - 2,4 L min <sup>-1</sup>	
pO <sub>2</sub> -Bereich	>20%	>20%
Inkubationszeit	48 h	48/72 h

### Prozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Die Kultivierungen im Litermaßstab wurden mit einem 7,5 L Rührkesselreaktor (Labfors 2, Infors, Bottmingen, Schweiz) mit 3 L Startvolumen durchgeführt (Abbildung 4.1). Der Kessel war mit drei 6-Blatt Scheibenrührern und einem Gasrohr bestückt. Mit Hilfe einer pH-Elektrode (Mettler-Toledo) und einer pO<sub>2</sub>-Sonde (InPro 6000, Mettler Toledo, Gießen) wurden die Kenngrößen in der Kultur gemessen. Die Regelung der Kenngrößen erfolgte über die Software Iris NT Pro Balance V4.11 (Infors, Bottmingen, Schweiz). Die Konzentrationen des Sauerstoffs und Kohlendioxids im Abgas wurden durch eine Abgasanalytik bestimmt (Easy Line, ABB, Mannheim). Das Volumen im Rührkessel wurde durch eine Waage (QC35 EDE-S, Sartorius, Göttingen) kontinuierlich aufgezeichnet.

Der Kessel wurde vorbereitet, die pH-Sonde kalibriert und das Medium nach dem Autoklavieren in den Kessel gepumpt. Nach dem Festlegen der Temperatur, der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl wurde die Sonde zum Messen des Sauerstoffpartialdrucks kalibriert. Die Inokulation mit der Vorkultur erfolgte aus einer Vorlageflasche mit Hilfe einer Schlauchpumpe (ISM444, Ismatek, Wertheim-Mondfeld). Die Zugabe des Zulaufmediums erfolgte kontinuierlich ebenfalls mit Hilfe der externen Schlauchpumpe.



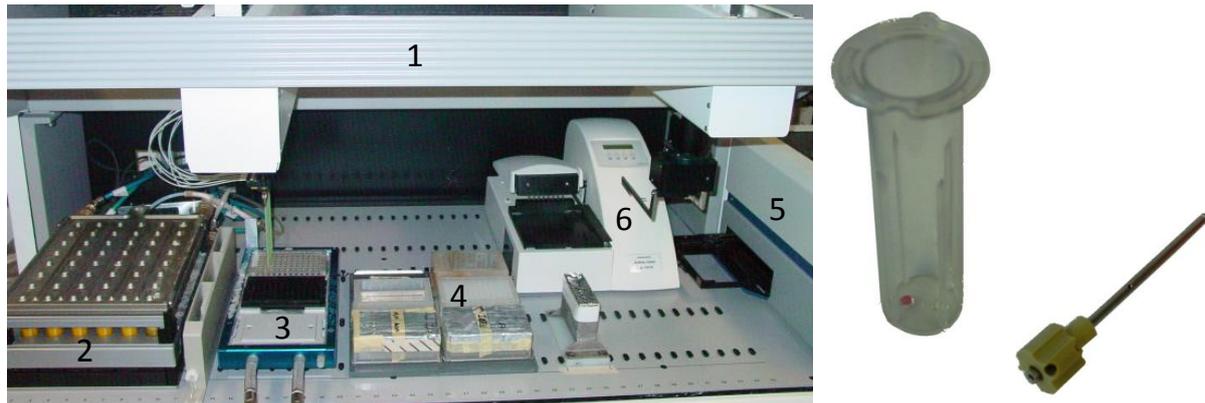
**Abbildung 4.1: Versuchsaufbau für Prozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

Dargestellt ist der Versuchsaufbau für Kultivierung von Mikroorganismen im Litermaßstab mit dem Vorlagegefäß für das Zulaufmedium (1), der externen Schlauchpumpe für den Zulauf (2), dem Rührkesselreaktor (3), der Waage zum ermitteln des Mediumvolumens (4), die Vorlagegefäße für Titrationsmittel und Antischaum (5), dem Prozessrechner (6) und der Abgasanalytik.

### Prozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab

Für die Kultivierungen im Millilitermaßstab wurde das 48-fach Rührkesselreaktorsystem (bioREACTOR, 2mag, München) unter der Sterilwerkbank mit Einwegreaktoren mit Strömungsbrechern bestückt. Die verwendeten und gekühlten Satzmedien wurden inokuliert (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6) und jeweils 8,3 mL des inokulierten Mediums in die Reaktoren gefüllt. Der Deckel mit den Rührern wurde zusammen mit dem Sterilfilter für die Begasung auf den bestückten Block gesetzt und auf dem Laborroboter (Genesis 150, Tecan Deutschland, Crailsheim) positioniert (Abbildung 4.2). Der Block wurde an die vortemperierten Wasserbäder für Temperierung und Kopfraumkühlung angeschlossen und die Begasung sowie die Rührer wurden mit den entsprechenden Bedingungen (Tabelle 4.17) gestartet. Die Steuerung des Roboters erfolgte über die zugehörige Software (Gemini 3.4 SP2, Tecan Deutschland, Crailsheim). Über diese wurden die pH-Regelung, die Probenahme zum Messen des pHs in Hydroplates (Presens, Regensburg) und die Zugabe von Zulaufmedium und Antischaum in die Reaktoren gesteuert. Die Zugabe des Zulaufs erfolgte nach dem Ende der Satzphase mit 35,6  $\mu\text{L}$ , was 0,042 g Glukose entsprach, in einer Abtastezeit von 10 min. Die Zugabe des Antischaums erfolgte nach vorher festgelegten Zugabeprofilen. Für die pH-Analytik wurde mit einer Abtastzeit von 30 min eine Probe genommen und in eine Hydroplate gegeben. Diese wurde über ein Fluoreszenzphotometer mit einem Lichtblitz mit

einer Wellenlänge von 538 nm angeregt und die Emission bei 620 nm gemessen. Die gemessenen Werte wurden mittels LabView 7.0 express (National Instruments, München) mit einer vorher durchgeführten Kalibrierung in pH-Werte konvertiert und die Volumina an Korrekturmittel für drei Zugaben innerhalb der Messperiode berechnet. Am Ende der Kultivierung wurden die Prozesssteuerung, die Rührer und die Temperierung gestoppt. Die Reaktoren wurden aus dem Block genommen und gewogen. Aus dem Kulturmedium wurde die BTM, der pH und die Riboflavinkonzentration bestimmt. Zudem wurde in einigen Reaktoren die Ammoniumkonzentration im Kulturmedium gemessen.



**Abbildung 4.2 Versuchsaufbau für Riboflavinproduktionsprozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab**

Dargestellt ist (A) der Laborroboter (1) mit den 48-Rührkesselreaktoren (2) und den Platten für die Probenahme und pH-Messung. Neben diesen sind Vorlagebehälter (3) für Zulaufmedium, Verdunstungsausgleich und Titrationsmittel zu erkennen (4). Ein Photometer (5) und ELISA-Washer (6) sind in den Prozess integriert. (B) Für die Prozesse wurden Polystyrolreaktoren und gasinduzierende Rührorgane verwendet.

## 4.2.2 Produktion von Hemicellulasen und Cellulasen

Im nachfolgenden Kapitel werden die Methoden zur Stammhaltung und Kultivierung von *A. aculeatus* und *T. reesei* beschrieben. Die Medien für die Kultivierung sind dabei in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

### 4.2.2.1 Mikroorganismen

Für die Produktion von Hemicellulasen wurde der Stamm *Aspergillus aculeatus* DSM2344 (auch CBS 101.43) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH verwendet. Dieser wurde ursprünglich von Novo Industry A/S (Dänemark) für die Produktion von Xylanasen genutzt. Der Stamm *Trichoderma reesei* RUT-C30 (ATCC 56765) für die Produktion von Cellulasen wurde in Absprache mit dem Kooperationspartner Süd-Chemie AG verwendet. Der Stamm stellt eine der am besten untersuchten Mutanten von *T. reesei* dar, da er sich durch eine besonders gute Cellulaseproduktion auszeichnet.

#### 4.2.2.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Pilze erfolgte in Form von Sporenlösungen, die bei -32 °C aufbewahrt wurden.

Sporen von *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 wurden von der Deutschen Stammsammlung (DSMZ) bezogen. Hierfür wurde das gelieferte Röhrchen nach Anleitung geöffnet und die Sporentablette in 0,5 mL einer sterilen Glycerin-TritonX100-Lösung (Tabelle 4.9) für 40 min bei Raumtemperatur gelöst. Die Suspension wurde in ein steriles 15 mL Reaktionsgefäß überführt und auf 5 mL mit der gleichen Lösung verdünnt. Zur Stammhaltung wurde ein Teil der Lösung als Aliquot bei -80 °C gelagert. Auf Kartoffel-Glukose-Agarplatten wurden jeweils ~70 µL der übrigen Lösung gegeben und für 9 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur kultiviert. Anschließend wurden die bewachsenen Platten mit der sterilen Glycerin-TritonX100-Lösung geerntet und die Lösung durch sterile Spritzen mit Glaswolle gefiltert. Von der Sporensuspension wurde photometrisch die OD<sub>600nm</sub> gemessen, aliquotiert und bei -32 °C aufbewahrt.

Die Stammhaltung von *Trichoderma reesei* RUT-C30 erfolgte analog zu dem Verfahren für den *Aspergillus*-Stamm. Die Stammhaltung der Sporenlösungen erfolgte anschließend bei -32 °C.

#### 4.2.2.3 Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden mit 100 mL der in Tabelle 4.12 und Tabelle 4.15 dargestellten Medien für *A. aculeatus* bzw. *T. reesei* in einem 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen in einem Schüttelinkubator (Multitron II, Infors, Bottmingen, Schweiz; Exzentrizität 5 cm) durchgeführt. Die Bedingungen für die Inkubation der Vorkultur sind in Tabelle 4.18 dargestellt.

**Tabelle 4.18: Inkubationsparameter für Vorkulturen zur Herstellung von Hemicellulasen und Cellulasen**

Parameter	<i>A. aculeatus</i> DSM 2344	<i>T. reesei</i> RUT-C30
Sporen im Medium (OD <sub>600nm</sub> )	0,1	0,01
Temperatur	30 °C	35 °C
Schüttelgeschwindigkeit	200 min <sup>-1</sup>	200 min <sup>-1</sup>
Inkubationszeit	72 h	72 h

#### 4.2.2.4 Kultivierungen

Die Kultivierungen zur Hemicellulase- und Cellulaseproduktion wurden mit den in Tabelle 4.12 und Tabelle 4.15 dargestellten Medien für *A. aculeatus* bzw. *T. reesei* durchgeführt. Die Kultivierungskenngrößen sind in Tabelle 4.19 aufgelistet. Es wurden 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, ein Literührkesselreaktor mit 2 L Startvolumen oder Milliliterreaktoren ohne Strömungsbrecher mit 10 mL Startvolumen verwendet.

**Tabelle 4.19: Prozessparameter zur Herstellung von Hemicellulasen und Cellulasen**

Parameter	<i>A. aculeatus</i> DSM 2344	<i>T. reesei</i> RUT-C30
Inokulationsvolumen	100 mL L <sup>-1</sup>	100 mL L <sup>-1</sup>
Temperatur	30 °C	35 °C
Temperatur nach 24 h	28 °C	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit im Schüttelinkubator	200 min <sup>-1</sup>	200 min <sup>-1</sup>
Rührerdrehzahl im Litermaßstab (Volumetrischer Leistungseintrag)	500-900 min <sup>-1</sup> ab 24h: 900 min <sup>-1</sup> (1,33-7,75 W L <sup>-1</sup> )	500-1000 min <sup>-1</sup> (1,33-10,63 W L <sup>-1</sup> )
Rührerdrehzahl im Millilitermaßstab (Volumetrischer Leistungseintrag)	1000 min <sup>-1</sup> (1,57 W L <sup>-1</sup> )	1200 min <sup>-1</sup> (2,83 W L <sup>-1</sup> )
Begasungsrate im Litermaßstab	0,25-1,5 vvm	0,25-1,5 vvm
Begasungsrate im Millilitermaßstab (alle Reaktoren)	1 L min <sup>-1</sup>	1 L min <sup>-1</sup>
pO <sub>2</sub> -Bereich	>20%	>15%
Inkubationszeit	96 h	96 h

### Prozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Die Kultivierungen im Litermaßstab wurden mit einem 7,5 L Rührkesselreaktor (Labfors 2, Infors, Bottmingen, Schweiz) mit 2 L Startvolumen durchgeführt (Abbildung 4.1). Der Kessel war mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern und einem Gasrohr bestückt. Mit Hilfe einer pH-Elektrode (Mettler-Toledo), einer pO<sub>2</sub>-Sonde (InPro 6000, Mettler Toledo, Gießen) und einer Biomassesonde (iSensor und iBiomass 400, Fogale nanotech, Nimes, Frankreich) wurden die Kenngrößen in der Kultur gemessen. Die Regelung der Kenngrößen erfolgte über die Software Iris V5.4 (Infors, Bottmingen, Schweiz). Die Konzentrationen des Sauerstoffs und Kohlendioxids im Abgas wurden durch eine Abgasanalytik bestimmt (Easy Line, ABB, Mannheim). Das Volumen im Rührkessel wurde durch eine Waage (QC35 EDE-S, Sartorius, Göttingen) kontinuierlich aufgezeichnet.

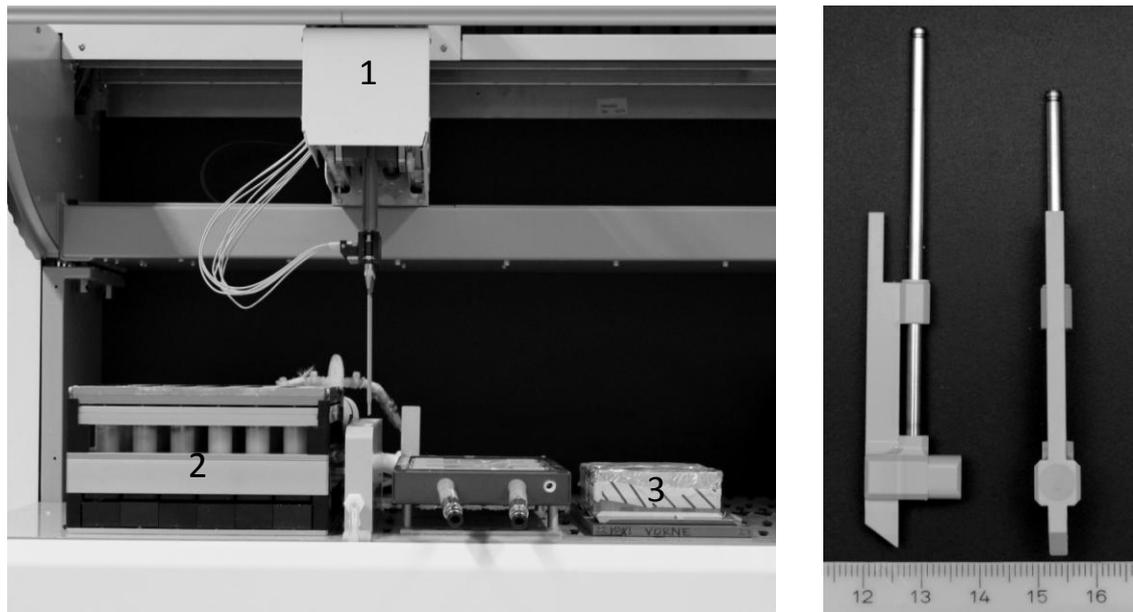
Der Kessel wurde vorbereitet indem feststoffhaltige Medien direkt in dem Kessel autoklaviert und volllösliche Medien nach dem Autoklavieren in den Kessel gepumpt wurden. Alle Reaktorarmaturen für Zuläufe wurden im Kessel mit Schläuchen so verlängert, dass Lösungen (Antischaum, Zulaufmedium, Korrekturmittel) direkt in die Flüssigphase gepumpt werden konnten und nicht auf die Kultur tropften. Nach dem Einstellen der Temperatur, der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl wurden die Sonden zur Bestimmung von Sauerstoffpartialdruck und Biomasse kalibriert. Die Inokulation mit der Vorkultur erfolgte aus einer Vorlageflasche mit Hilfe einer Schlauchpumpe (ISM444, Ismatek, Wertheim-Mondfeld). Die Zugabe des Zulaufmediums erfolgte ebenfalls mithilfe der externen Schlauchpumpe durch eine automatische Ansteuerung aus der Prozesssoftware, wobei die Zulauftrate 70 mL d<sup>-1</sup> für *A. aculeatus* und 100 mL d<sup>-1</sup> für *T. reesei* mit einer Abtastrate von 12 h betrug. Proben wurden manuell mithilfe einer Spritze aus dem Reaktor entnommen, wobei 10-15 mL als Vorlauf verworfen wurden.

### Prozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab

Die Kultivierungen im Millilitermaßstab wurden mit einem 48-fach Rührkesselreaktor (bioREACTOR, 2mag, München) unter Verwendung der Paddelrührer (Hortsch et al., 2010a) durchgeführt. Hierfür wurden Polystyrol-Einwegreaktoren ohne Strömungsbrecher unter der Sterilwerkbank in den Block mit dem Antrieb eingesetzt.

Für *A. aculeatus* wurden die Kulturen 24 h unter den in Tabelle 4.19 angegebenen Bedingungen in drei Schüttelkolben kultiviert, vereinigt und jeweils 10 mL in die 16 verwendeten Reaktoren übertragen. Für Kultivierungen mit *T. reesei* wurden 9 mL des Kulturmediums (Tabelle 4.15) in den Reaktoren vorgelegt und jeder Reaktor mit 1 mL einer Vorkultur inokuliert. Der Deckel mit den Rührern wurde zusammen mit dem Sterilfilter für die Begasung auf den bestückten Block gesetzt und auf dem Laborroboter (Genesis 150, Tecan Deutschland, Crailsheim) positioniert. Der Block wurde an die vortemperierten Wasserbäder für Temperierung und Kopfraumkühlung angeschlossen und die Begasung sowie die Rührer wurden mit den entsprechenden Bedingungen (Tabelle 4.19) gestartet.

Die Steuerung des Roboters erfolgte über die zugehörige Software (Gemini 4.3, Tecan Deutschland, Crailsheim), die wiederum durch die Prozesssteuerung (Fed-Batch XP, DasGip, Aachen) kontrolliert wurde. Über diese wurden der Verdunstungsausgleich und die Zugabe des Zulaufmediums in die Reaktoren gesteuert. Die Kultivierung erfolgte für *A. aculeatus* für die übrigen 72 h und für *T. reesei* für die gesamten 96 h des Prozesses. Die Zugabe des Zulaufs erfolgte mit  $700 \mu\text{L d}^{-1}$  für *A. aculeatus* direkt nach dem Start im bioREACTOR und für *T. reesei* mit  $1000 \mu\text{L d}^{-1}$  nach der Satzphase von 24 h in einer Abtaste von jeweils 12 h. Zum Abbruch der Kultivierung wurden die Prozesssteuerung, die Rührer und die Temperierung gestoppt. Die Reaktoren wurden aus dem Block genommen und gewogen. Für die Analyse wurde teilweise das Wachstum von Rand und Rührern der Reaktoren zur Bestimmung der Trockenmasse abgenommen. Aus dem Kulturmedium wurde die BTM, der pH, der Proteingehalt und die Enzymaktivitäten bestimmt.



**Abbildung 4.3: Versuchsaufbau für Prozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab**

Dargestellt ist (A) der Laborroboter (1) mit den 48-Rührkesselreaktoren (2), den Vorlagebehältern für Zulaufmedium und Verdunstungsausgleich (3) und (B) der für die Prozesse verwendete Paddelrührer.

### Kultivierungen im Schüttelkolben

Die Kultivierungen im Schüttelkolben erfolgten analog der Tabelle 4.19. Für die Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 wurden die Kolben ebenfalls unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Nach der 24 h langen Satzphase wurden die Kolben mit einer Abtastzeit von 12 h aus dem Schüttler unter die Sterilwerkbank genommen und jeweils 5 mL des Zulaufmediums manuell mit einer Pipette zugegeben.

## 4.3 Analytische Methoden

In den folgenden Abschnitten sind Methoden beschrieben, die für die Bestimmung von Substraten in den Medien, dem Wachstumsverhalten sowie der Produktion in den Kulturen verwendet wurden. Dazu gehören sowohl die Messung von Riboflavin im Kulturmedium als auch die Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen von Hemicellulasen und Cellulasen.

### 4.3.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Für die Bestimmung von Zellkonzentrationen gibt es verschiedene Methoden. Die am weitesten Verbreiteten sind die Bestimmung der optischen Dichte (OD) – vor allem bei Bakterienkulturen – und die Biotrockenmasse, die für alle Kultivierungen nutzbar ist.

#### 4.3.1.1 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) der Kulturen von *B. subtilis* wurde in einem Einstrahlphotometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei einer Wellenlänge von 650 nm bestimmt. Die zu vermessende Probe wurde mit Natriumphosphatpuffer soweit verdünnt, dass die Absorption in einer Polystyrol-Einmalküvette bei maximal  $OD_{650nm} = 0,3$  lag. Die Korrelation der optischen Dichte mit der Biotrockenmasse ( $c_x$ ) lässt sich durch Gleichung 4.1 erstellen (Vester, 2009b):

$$c_x = 0,33 \text{ g L}^{-1} \cdot OD_{650nm} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

#### 4.3.1.2 Gravimetrische Bestimmung der Biomassekonzentration

Bei hohen Zellkonzentrationen und bei Kulturproben, die Riboflavin enthalten, ließ sich die Zelldichte von *B. subtilis* nicht über die optische Dichte bestimmen. Zu diesem Zweck wurde die Zelldichte als Biotrockenmassekonzentration (BTM) gravimetrisch bestimmt.

Vor dem Start der Kultivierung wurden 1,5 mL-Reaktionsgefäße bei 80 °C für mindestens 24 h getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. In die Kulturgefäße wurde 1 mL der Zellsuspension gegeben, für 10 min bei  $13.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Ansatz im offenen Gefäß bei 80 °C für mindestens 48 h getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Kulturgefäße erneut gewogen. Die Biotrockenmasse konnte aus der Massendifferenz des leeren ( $m_{\text{leer}}$ ) und vollen ( $m_{\text{voll}}$ ) Kulturgefäßes ohne die im Kulturmedium enthaltenen Riboflavinkristalle (Gleichung 4.2) berechnet werden. Das Gewicht der Probe musste zudem auf das Probenvolumen ( $V_{\text{Probe}}$ ) bezogen werden. Diese ließen sich aus der Riboflavinkonzentration ( $c_{RF}$ ) berechnen, wobei  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  als gelöstes Riboflavin vorliegen und nicht abgezogen wurden:

$$BTM = \frac{(m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}})}{V_{\text{Probe}}} - (c_{RF} - 0,2 \text{ g}_{RF} \text{ L}^{-1}) \quad \text{Gleichung 4.2}$$

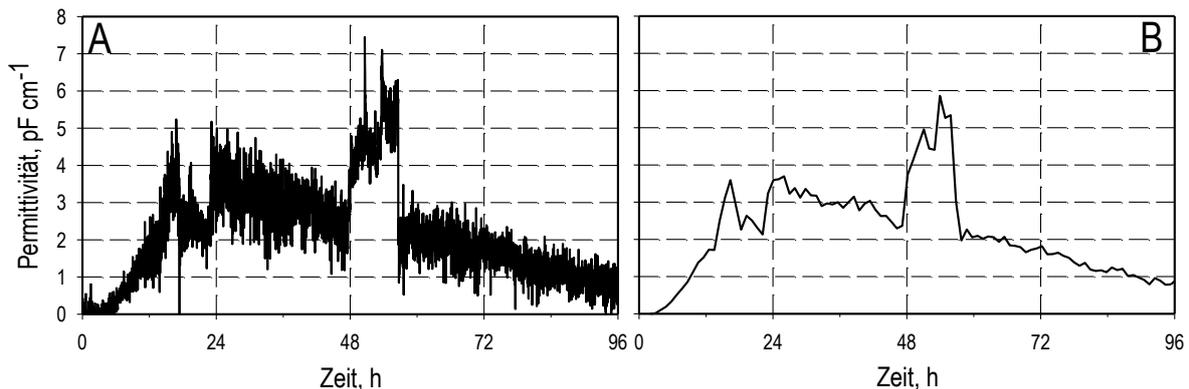
Für Kultivierungen mit *A. aculeatus* und *T. reesei* wurde die Bestimmung der Biotrockenmasse analog zu der Bestimmung mit *B. subtilis* durchgeführt. Es wurden jedoch 2 mL in 2 mL-Reaktionsgefäßen oder 5 mL in 15 mL Reaktionsgefäßen als Proben verwendet, wobei eine Korrektur der BTM um den Riboflavinanteil nicht nötig war. Für Kultivierungen mit Feststoffsubstraten konnte nur die Trockenmasse bestimmt werden, die sich aus Substrat und Biomasse zusammensetzte. Zur Bestimmung von Trockenmasse und Biotrockenmasse an der Reaktorwand und dem Rührer wurde die Masse mit einer Impfnadel abgenommen und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für mindestens 72 h getrocknet.

#### 4.3.1.3 Bestimmung der Lebendbiomassekonzentration mittels Kapazitätssonde

Während der Prozesse zur Cellulase- und Hemicellulaseproduktion wurde eine Biomassesonde (iSensor und iBiomass 400, Fogale nanotech, Nimes, Frankreich) zur online

Messung der Lebendbiomassekonzentration eingesetzt. Die Sonde wurde, wie eine  $pO_2$ -Sonde in den Deckel eingebaut und mit dem Rührkesselreaktor autoklaviert. Beim Einbau wurde auf einen Abstand von 1 cm von den Einbauten und der Reaktorwand geachtet. Zudem wurde der Messkopf in vertikaler Richtung zwischen die Rührer gesetzt, um ein direktes Anströmen vom Rührer zu verringern. Während des Prozesses wurde sowohl die Permittivität (in  $pF \cdot cm^{-1}$ ), als auch die Leitfähigkeit (in  $mS \cdot cm^{-1}$ ) gemessen.

Zwei Elektroden an dem Sensor erzeugen in einer Frequenz (hier 2000 Hz und 10000 Hz als Referenz) ein elektrisches Feld. Durch dieses werden Zellen mit intakter Zellmembran polarisiert und verhalten sich als Kondensatoren. Bei der Reduzierung des elektrischen Felds wird ausgehend von den Kondensatoren ein Strom freigesetzt, der gemessen werden kann. Diese Kapazität ist proportional zu der lebenden Biomasse und wird über den Sensor gemessen. Dabei kommt es besonders bei Pilzprozessen aufgrund des inhomogenen Mediums zu Schwankungen im Signal. Die erhaltenen Kurven wurden für eine bessere Darstellung mit „Sigmaplot 10“ (Systat Software, Inc., San Jose, USA) geglättet (Abbildung 4.4). Dabei wurde die Methode des „gleitenden Mittelwerts“ mit einem Abtastanteil (sampling proportion) von 0,01 verwendet. Dies ergab 100 Intervalle in x-Richtung und 15 Intervalle in Y-Richtung.



**Abbildung 4.4: Bearbeitung von Rohdaten der online gemessenen Lebendbiomassekonzentration**

Dargestellt sind die Rohdaten der online gemessenen Lebendbiomassekonzentration (A) und die vereinfachten Daten (B) eines Prozesses zur Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus*. Die Permittivität lässt sich proportional mit der lebenden Biomasse korrelieren.

### 4.3.2 Glukosemessung

Die Messung der Glukosekonzentration in der Fermentationslösung mit *B. subtilis* während der Kultivierung wurde mit Hilfe eines Blutzuckeranalysegerätes durchgeführt (Accu-Check<sup>®</sup>, Roche Diagnostics). Hierfür wurde eine Probe des Kulturmediums zu Beginn der Fermentation 1:10 mit Natriumphosphatpuffer (Kapitel 4.1.1.6) verdünnt und später direkt vermessen, sodass eine Glukosekonzentration von  $0,1 - 6,0 \text{ g L}^{-1}$  in der Probe war. 1 Tropfen der Probe wurde an die Kapillare des Messstreifens gehalten und von diesem über Kapillarkräfte eingezogen.

### 4.3.3 Riboflavinmessung

Die Konzentration an Riboflavin ( $c_{RF}$ ) im Kulturmedium wurde durch Absorptionsmessungen bestimmt. Hierfür wurden 20  $\mu\text{L}$  Kulturlösung in 200  $\mu\text{L}$  1 M NaOH gelöst und 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 180  $\mu\text{L}$  1,5 M Zitronensäure neutralisiert und mit 700 beziehungsweise 1400  $\mu\text{L}$  Natriumphosphatpuffer verdünnt. Die Lösung wurde 5 min bei  $13.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert um die restliche Zellmasse abzutrennen. 100  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurden in 900  $\mu\text{L}$  Puffer in einer Einwegküvette bei 444 nm gegen Puffer in einem Photometer (Spectronic Biomate 3, Thermo Electron Corporation, Madison USA) vermessen, so dass die Absorption ( $Abs_{444}$ )  $< 0,9$  war. Die sich so ergebenden Verdünnungen (VF) von 1:550 und 1:900 ließen sich in Riboflavinkonzentrationen umrechnen (Vester, 2009b).

$$c_{RF} = VF \cdot Abs_{444} \cdot 0,3305 \text{ g L}^{-1} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

### 4.3.4 Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen

Die Ammoniumkonzentration im Medium wurde über einen Ammoniaktest (Ammoniak UV Test, R-Biopharm, Darmstadt) gemessen. Der Test basiert auf der Umsetzung von NADH zu  $\text{NAD}^+$  und der dadurch verbundenen Abnahme der Absorption bei 340 nm. Dabei setzt die Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) 2-Oxoglutarat zusammen mit NADH und  $\text{NH}_4^+$  zu L-Glutamat,  $\text{NAD}^+$  und  $\text{H}_2\text{O}$  um. Die Analyse ermöglicht die Vermessung von Proben mit einem Konzentrationsbereich von 0 und  $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ .

Die Messung für Proben aus Kultivierungen zur Riboflavinproduktion wurden nach Anleitung in einem 3 mL-Maßstab und die Proben für Kultivierungen mit *T. reesei* RUT-C30 zur Produktion von Cellulasen in der 96-Well-Platte durchgeführt (Tabelle 4.20). Hierfür wurden die Proben 1:100 für die Riboflavinproduktion und 1:10 für die Cellulaseproduktion mit VE- $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Die Probe, der Leerwert oder der Standard wurden mit Lösung 1 (2-Oxoglutarat, Triethanolaminpuffer, NADH) und VE- $\text{H}_2\text{O}$  in einer 3 mL Einmalküvette oder dem Well der 96-Well-Platte vermischt und  $\sim 5$  min inkubiert. Die Extinktion ( $E_1$ ) wurde bei  $\text{OD} = 340 \text{ nm}$  bestimmt (Einstrahlphotometer oder Platten-Photometer). Die Enzymlösung wurde zum Beginn der Reaktion hinzugegeben. Für die Ansätze in der 96-Well-Platte wurde die Enzymlösung 1:5 mit Lösung 1 verdünnt. Nach 20 min Inkubation wurde die Absorption erneut gemessen ( $E_2$ ). Die Ammoniakkonzentration wird aus der Differenz ( $\Delta E$ ) der beiden gemessenen Werte, die um den Leerwert korrigiert werden mit Hilfe der Standardgeraden berechnet (Gleichung 4.4).

$$\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

**Tabelle 4.20: Durchführung und Volumina des Ammoniaktests in zwei Maßstäben**

Lösung	3 mL Küvette	96-Well-Platte
Lösung 1	1 mL	100 µL
Probenvolumen	100 µL	10 µL
VE-H <sub>2</sub> O	1,9 mL	190 µL
Inkubation 5 min		
Absorptionsmessung ( $E_1$ )		
Enzymlösung	20 µL	10 µL (1:5)
Inkubation 20 min		
Absorptionsmessung ( $E_2$ )		

### 4.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Hierfür wurde der Kulturüberstand mit 50 mM Natriumcitrat Puffer pH 5,3 für Kultivierungen mit *A. aculeatus* und pH 4,8 für die mit *T. reesei* auf eine Konzentration von 1,25 – 20 g L<sup>-1</sup> Protein verdünnt. Die Standardkurve wurde mit Bovine Serum Albumin (BSA) im selben Bereich im entsprechenden Puffer angesetzt. Von den Proben und den Standards wurden jeweils 150 µL in einem Dreifachansatz in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde mit einer Multistep-Pipette 150 µL des Bradfordreagenz zu jeder Probe gegeben, die Platte vorsichtig auf einem Plattenschüttler (Variomag monoshake, H&P Labortechnik, Oberschleißheim) gemischt und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei OD = 595 nm in einem Photometer (Infinite® M200; Tecan Deutschland, Crailsheim) vermessen und die Proteinkonzentrationen in den Proben mit Hilfe des Standards berechnet.

### 4.3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Für die Bestimmung von Hemicellulase- und Cellulaseaktivitäten können verschiedene Tests verwendet werden, die jeweils die Aktivitäten von unterschiedlichen Enzymen im Enzymsystem bestimmen. Hierbei hat nicht nur das verwendete Substrat Einfluss auf die gemessenen Enzymaktivitäten sondern auch die Messmethode des Produktes und die verwendeten Bedingungen. Für die Bestimmung der Aktivitäten der produzierten Enzyme wurden die folgenden Enzymtests verwendet.

#### 4.3.6.1 *p*-Nitrophenyl basierte Enzymtests

Die Enzymtests mit *p*-Nitrophenyl-Substraten basieren auf volllöslichen Substraten und messen in der Regel nur ein Enzym, wobei Nebenaktivitäten von anderen Enzymen gegenüber den Substraten teilweise bekannt sind. Die Tests basieren auf Zuckerresten, die mit *p*-Nitrophenyl gekoppelt sind. Dieses wird während der Reaktion von den Zuckern

abgespalten und kann als *p*-Nitrophenol im Basischen durch einen Farbumschlag bei einer Absorption von 405 nm gemessen werden. Mit den verwendeten Substraten wird hauptsächlich die Aktivität eines Enzyms bestimmt, und zwar mit 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside (pNPX) von der  $\beta$ -D-Xylosidase, mit 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (pNPGal) von der  $\beta$ -D-Galactosidase, mit 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Cellobioside (pNPC) von der Cellobiohydrolase 1 (CBH1) und mit 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (pNPGlu) von der  $\beta$ -D-Glukosidase.

Die Tests wurden in 96-Well Platten in einem Platteninkubator bei 50°C (Einstellung 60 °C, Thermoschüttler, neoLab, Heidelberg) durchgeführt. Die Temperatur des Platteninkubators wurde auf 60 °C gestellt, um in der Lösung in den Platten die gewünschte Temperatur von 50 °C zu erreichen. Die Kulturüberstände wurden so mit dem entsprechenden Puffer (Kapitel 4.1.2.5) verdünnt, dass eine Absorption von 0,2 – 2,5 am Ende des Tests gemessen wurde. Die Standards wurden aus einer 10 mM *p*-Nitrophenol-Lösung in dem entsprechenden Puffer auf Konzentrationen von 0,5 mM bis 0,01563 mM verdünnt. Bei der Durchführung wurden Leerwerte einfach und Standards und Proben doppelt beziehungsweise dreifach in der Platte analog des Schemas in Tabelle 4.21 vorgelegt. In die Proben wurde anschließend das Substrat (Kapitel 4.1.2.6) mit einer Multistep-Pipette hinzugegeben, die Platte auf einem Plattenschüttler (Variomag monoshake, H&P Labortechnik, Oberschleißheim) gemischt und im Platteninkubator (Thermoschüttler, neoLab, Heidelberg) bei 700 min<sup>-1</sup> für Proben der Kultivierungen mit *A. aculeatus* und 350 min<sup>-1</sup> für Überstände aus *T. reesei* Kultivierungen für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte weitere 5 min zum Beenden der Reaktion auf Eis inkubiert, bevor zu allen Ansätzen 1 M Natriumcarbonatlösung (Kapitel 4.1.2.4) hinzugegeben wurde. Die Platte wurde getrocknet und die Absorption in einem Plattenphotometer (Infinite M200; Tecan Deutschland, Crailsheim) bei 405 nm bestimmt. Für die Enzymaktivität wurde 1 nkat als die Freisetzung von 1 nmol *p*-Nitrophenol pro Sekunde definiert.

**Tabelle 4.21: Durchführung von *p*-Nitrophenyl basierten Enzymtests**

Lösung	Standard	Leerwert	Probenleerwert	Probe
Puffer		100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	
Standard	100 $\mu$ L			
Probe			50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Substrat				50 $\mu$ L
Inkubation, 10 min, 50 °C				
Reaktion auf Eis stoppen, 5 min				
Natriumcarbonat	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Absorption messen				

#### 4.3.6.2 Bestimmung von Filterpapieraktivitäten (FPU)

Die Bestimmung von Filterpapieraktivitäten (Ghose, 1987) ist für das Messen von Cellulaseaktivitäten aller in der Lösung enthaltenen Cellulasen die in der Literatur am

häufigsten verwendete Methode. Der Vorteil dieses Enzymtests besteht in der Verwendung des Whatman No. 1 Filterpapiers, das ein definiertes Substrat aus Feststoff darstellt. Zudem werden in dem Test die Enzymkonzentrationen im Verhältnis zum Substrat konstant gehalten, um Unterschiede durch unterschiedliche Enzymladungen auf dem Substrat zu minimieren.

In dem von der IUPAC herausgegebenen Protokoll (Ghose, 1987) wird ein Filterpapierstreifen von 1 x 6 cm mit 1,5 mL Puffer und 0,5 mL Probe für 60 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird 3 mL DNS-Lösung (Kapitel 4.1.2.3) hinzugegeben und der Farbumschlag des Ansatzes durch Kochen für 5 min in einem Wasserbad hervorgerufen. Da diese Methode für den Hochdurchsatz zu aufwändig ist, wurde von Xiao et al. (2004) der Test auf ein 96-Well-Format verkleinert. In einer weiteren Modifikation konnten mit dem hier beschriebenen Protokoll, durch die Anpassung der Schüttelgeschwindigkeit, Bedingungen bestimmt werden, die direkt mit dem Originalprotokoll vergleichbar sind.

Für die Durchführung wurden die Proben in einer Deep-Well-Platte in 3 Verdünnungsstufen in dem 50 mM Natriumcitratpuffer pH 4,8 (Kapitel 4.1.2.5) angesetzt. Für Experimente im Millilitermaßstab, Schüttelkolben und im Litermaßstab bis 60 h wurden Verdünnungen von 1,5; 5 und 20 angesetzt. Proben aus dem Litermaßstab, die von 72 - 96 h genommen wurden, wurden mit den Faktoren 3, 10 und 40 verdünnt. Mithilfe eines herkömmlichen Bürolochers wurden Scheiben aus Filterpapier mit einem Durchmesser von  $5,5 \pm 0,1$  mm hergestellt. In einer 96-Well-Platte (Nunc, F96) konnten 8 Proben parallel analysiert werden. Dafür wurden dreimal 3 Reihen mit dem Filterpapier bestückt. In allen Vertiefungen wurde 64  $\mu\text{L}$  Puffer vorgelegt und in zwei Reihen ohne Filterpapier wurden 32  $\mu\text{L}$  des Glukosestandards mit den Konzentrationen  $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  und  $0 \text{ g L}^{-1}$  doppelt aufgetragen, so dass sich die Standardreihe vierfach auf der Platte befand. 32  $\mu\text{L}$  der Proben in den drei Verdünnungen wurden jeweils zweifach in die Vertiefungen mit Filterpapier gegeben. Die Platte wurde auf einem Plattenschüttler (Variomag monoshake, H&P Labortechnik, Oberschleißheim) gemischt und mit einer Schüttelgeschwindigkeit von  $350 \text{ min}^{-1}$  und  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  in einem Platteninkubator (Einstellung  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , Thermoschüttler, neoLab, Heidelberg) inkubiert. Die Schüttelfrequenz wurde zuvor mit dem Standard FPU-Test nach Ghose korreliert und für das hier verwendete System als beste Korrelation bestimmt. Nach 60 min wurden 192,6  $\mu\text{L}$  DNS-Lösung (Kapitel 4.1.2.3) in alle Vertiefungen gegeben. In die Leerwerte für die Proben mit den Filterpapierscheiben wurden 32  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Verdünnung pipettiert und alle Lösungen in beschriftete 1,5 mL „Safe-Lock“-Reaktionsgefäße überführt. 36 Proben und zwei Standardreihen wurden zusammen für 5 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend direkt auf Eis überführt. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei  $13.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und 40  $\mu\text{L}$  des Überstandes in 180  $\mu\text{L}$  VE- $\text{H}_2\text{O}$  in einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und vermischt. Die Absorption der Platte wurde bei 540 nm in einem Plattenphotometer (Infinite M200; Tecan Deutschland, Crailsheim) gemessen. Von den jeweiligen Verdünnungen und Standards wurde der Mittelwert bestimmt, mit dem jeweiligen Leerwert korrigiert und mit Hilfe des Standards in Glukosekonzentrationen in den Proben

berechnet. Die Berechnung der Filterpapierunits (FPU) erfolgt analog Ghose (1987). Hierbei wird die Enzymverdünnung bestimmt, bei der in dem hier angegebenen Maßstab exakt 128 ng Glukose freigesetzt würden. Die Filterpapierunits sind laut IUPAC nur für Aktivitäten über  $0,37 \text{ FPU mL}^{-1}$  definiert.

#### 4.3.6.3 Bestimmung von Xylanaseaktivitäten

Für die Bestimmung der Xylanaseaktivitäten (Endo-1,4- $\beta$ -D-Xylan Xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) im Kulturüberstand wurde der Xylanasetest nach Bailey et al. (1992) verwendet. Analog zu dem Filterpapieretest wurde der Test in einem 2 mL-Maßstab entwickelt. Die hier beschriebene Methode ist eine Maßstabsverkleinerung. Ein Vergleich mit dem Standardtest zeigte vergleichbare Aktivitäten.

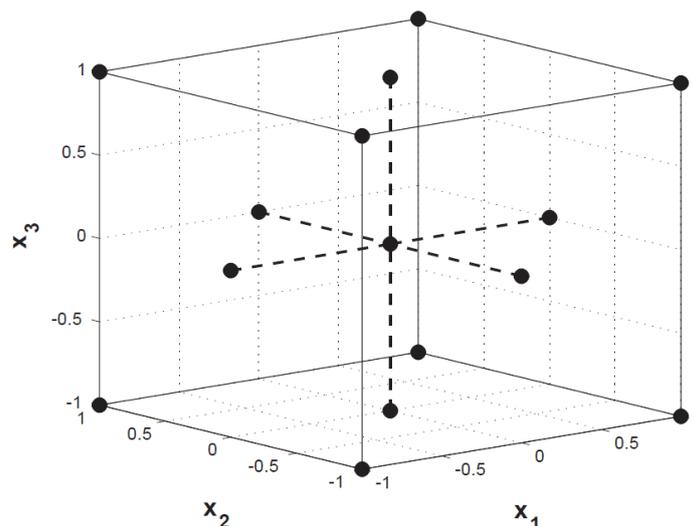
In einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc, F96) wurden entsprechend der Anzahl an Proben, Standards und Leerwerten  $108 \mu\text{L}$  einer 1 % Birkenxylanlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5,3 (Kapitel 4.1.2.7) vorgelegt. Die Platte wurde zum vortemperieren der Lösung für 7 min bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  im Schüttelinkubator inkubiert (Einstellung  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , Thermoschüttler, neoLab, Heidelberg).  $12 \mu\text{L}$  der in dem Puffer verdünnten Proben wurden anschließend dreifach in die Substratlösung gegeben und mit einem Plattenschüttler (Variomag monoshake, H&P Labortechnik, Oberschleißheim) gemischt. Zum Ausgleich des schnelleren Ansetzens im Vergleich zum Standardtest wurde die Platte für 30 s ruhen gelassen und anschließend 5 min im Thermoinkubator bei einer Schüttelgeschwindigkeit von  $700 \text{ min}^{-1}$  und  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden  $180 \mu\text{L}$  DNS-Lösung (Kapitel 4.1.2.3) in alle Ansätze gegeben. Als Standard wurden  $15 \text{ g L}^{-1}$  Xylose in dem verwendeten Puffer angesetzt und in Konzentrationen von  $15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  und  $0 \text{ g L}^{-1}$  verwendet.  $12 \mu\text{L}$  des Standards wurden vierfach aufgetragen und die Enzymlösung in die Probenleerwerte gegeben und alle Lösungen in beschriftete  $1,5 \text{ mL}$  „Safe-Lock“-Reaktionsgefäße überführt. 36 Proben und zwei Standardreihen wurden zusammen für 15 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend direkt auf Eis überführt. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei  $13.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und  $150 \mu\text{L}$  des Überstandes in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption der Proben auf der Platte wurde bei  $540 \text{ nm}$  in einem Plattenphotometer (Infinite M200; Tecan Deutschland, Crailsheim) gemessen. Von den jeweiligen Verdünnungen und Standards wurden die Mittelwerte bestimmt, mit dem Leerwert korrigiert und mithilfe des Standards die Proben in Xylosekonzentrationen umgerechnet. Für die Enzymaktivität wurde 1 nkat als die Freisetzung von 1 nmol Xylose pro Sekunde definiert.

## 4.4 Optimierung

Die Durchführung der Optimierung der Hemicellulase- und Cellulaseproduktion wurde mithilfe eines experimentellen Designs durchgeführt. Der verwendete quadratische Polynomansatz (Response Surface Methodology (RSM), Gleichung 4.5) zur empirischen Beschreibung des Einflusses von drei Medienbestandteilen auf die Enzymaktivität (in  $\text{nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $\text{FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) benötigte 15 Experimente zur Parameteridentifikation von  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  und  $\beta_{ii}$  für den experimentellen Raum des *Central Composite Designs* (Abbildung 4.5).

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j < i=1}^k \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \\ &= \beta_0 - \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \\ &\quad \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \end{aligned} \quad \text{Gleichung 4.5}$$

Die verwendeten codierten Variablen wurden in drei Stufen (Level) als codierte Variablen  $x_1$ ,  $x_2$  und  $x_3$  (Tabelle 4.22) zur Erstellung der experimentellen Versuchsplanung verwendet (Tabelle 4.23). Alle experimentellen Bedingungen mussten zur Lösung des Polynoms untersucht werden. Der Modelltyp „faced“ hat den Vorteil, dass für die Variablen Konzentrationen von  $0 \text{ g L}^{-1}$  eingesetzt werden können und jeweils nur in drei Konzentrationen untersucht werden müssen. Nachteilig ist, dass dieser Typ keine Informationen über Punkte außerhalb des experimentellen Raums liefert und dadurch die quadratischen Effekte nur mit einer geringeren Auflösung bestimmt werden als mit anderen Modelltypen. Die experimentellen Bedingungen des „Sterns“ und des Mittelpunkts (Abbildung 4.5) sind für die Lösung der Effekte zweiter Ordnung nötig.



**Abbildung 4.5: Versuchsplan zur Identifikation der Parameter eines Polynoms zweiter Ordnung**

Dargestellt ist das verwendete „Central Composite Design“ des Typs „faced“ mit den codierten Variablen für das Polynom zweiten Grades. Bei diesem Modell liegen alle durchzuführenden experimentellen Bedingungen (●) innerhalb und auf den Grenzlinien des experimentellen Raums. Die Variablen  $x_1$ ,  $x_2$  und  $x_3$  werden in der codierten Form dargestellt und wurden mit den in Tabelle 4.22 dargestellten Bedingungen verwendet.

**Tabelle 4.22: Verwendete Substratmengen zur Identifikation der Modellparameter**

Dargestellt sind die Modellvariablen und die zugehörigen Mengen an Substrat, die zur Erstellung der Modelle über das Zulaufmedium pro Liter und Tag zugeführt wurden oder in dem Satzmedium vorgelegt wurden.

	Variable	Substrat	Level -1	Level 0	Level 1
<b>Optimierung der Hemicellulaseproduktion</b>	x <sub>1</sub>	Xylan, g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0,00	1,67	3,33
	x <sub>2</sub>	Laktose, g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0,00	2,00	5,00
	x <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0,00	1,00	2,00
<b>Optimierung der Cellulaseproduktion</b>	x <sub>1</sub>	Cellulose (Avicel PH101), g L <sup>-1</sup>	0,00	40,0	80,00
	x <sub>2</sub>	Laktose, g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0,00	7,50	15,00
	x <sub>3</sub>	Ammoniumsulfat, g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0,00	2,50	5,00

Für die Erstellung von Modellen zur Enzymproduktion wurden die Aktivitäten des jeweiligen Enzyms oder Enzymsystems für jedes der 15 Experimente bestimmt. Anschließend wurde das Polynom zweiten Grades mit Hilfe von MATLAB2009b (Mathworks, Natick Massachusetts, USA) gelöst und die Signifikanz der Polynomparameter ( $\beta_n$ ) überprüft.

**Tabelle 4.23: Experimenteller Versuchsplan der kodierten Variablen zur Lösung des Polynoms zweiter Ordnung**

Experiment Nummer:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
x <sub>1</sub>	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	0	0	0	0	0
x <sub>2</sub>	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	-1	1	0	0	0
x <sub>3</sub>	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0	-1	1	0

#### 4.4.1 Optimierung der Hemicellulaseproduktion

Für die Durchführung der Optimierung der Hemicellulaseproduktion wurden die Kultivierungen wie in Kapitel 4.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Es standen hierfür 16 Prototypen des Paddelrührers (Hortsch, 2011b) zur Verfügung. Während der Kultivierung im Millilitermaßstab wurden 4 Rührkesselreaktoren im Satzbetrieb unter Referenzbedingungen mit Verdunstungsausgleich betrieben. Mit den restlichen zwölf Reaktoren wurden 4 experimentelle Bedingungen parallel im Dreifachansatz untersucht. Die Reihenfolge der Kultivierungen der Experimente und damit auch die Positionen im bioREACTOR wurden per Zufall bestimmt. Die Reihenfolge war Experiment 15 13 6 10 || 12 4 8 7 || 2 14 9 5 || 3 15 1 11. Für die Erstellung von Modellen wurden die Aktivitäten aller Xylanasen (Kapitel 4.3.6.3) und der  $\beta$ -Xylosidase und  $\beta$ -Galactosidase bestimmt (Kapitel 4.3.6.1). Bei der Lösung der Gleichung wurden die Variablen Xylan und Ammoniumnitrat getauscht, sodass die Parameter mit der „1“ den Einfluss von Ammoniumnitrat beschreiben und mit der „3“ den von Xylan.

#### 4.4.2 Optimierung der Cellulaseproduktion

Für die Durchführung der Optimierung der Cellulaseproduktion wurden die Kultivierungen wie in Kapitel 4.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Im Millilitermaßstab wurden alle 15 Experimente in einem parallelen Dreifachansatz in den zur Verfügung stehenden 48

Rührkesselreaktoren betrieben. Die experimentelle Bedingung 15, welche den Mittelpunkt des Versuchsraums darstellt (Abbildung 4.5) wurde in sechs parallelen Reaktoren kultiviert, um alle 48 Reaktoren zu belegen. Für alle Reaktoren wurde nach Abschluss der Kultivierung die Filterpapieraktivität (Kapitel 0) und die der  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galactosidase (Kapitel 4.3.6.1) bestimmt. Die Kultivierung aller 15 Experimente wurde wiederholt und aus den Mittelwerten wurde für die Filterpapieraktivitäten das Polynom zweiter Ordnung gelöst. Die Optimierung im Schüttelkolben wurde analog mit zwei Kulturen für jeden experimentellen Ansatz durchgeführt und wurde ebenfalls sequenziell wiederholt. Lediglich die Experimente 11 - 14 wurden in den Schüttelkolben in einer Kultivierung einfach und in der zweiten in einem Zweifachansatz kultiviert.

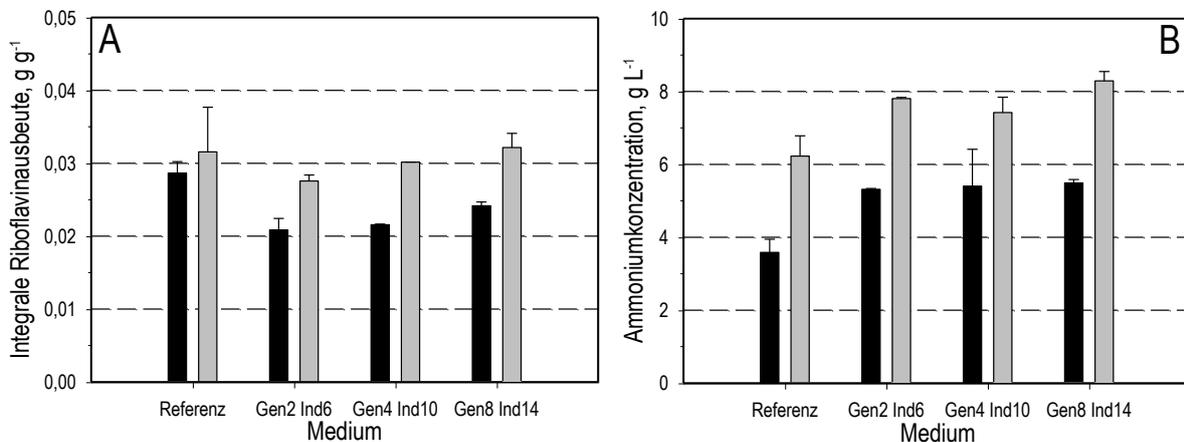
## 5 Reaktionstechnische Untersuchungen der Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> im Zulaufverfahren

Die Produktion von Riboflavin mit *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> (im folgenden *B. subtilis*) ist ein gut beschriebener Prozess der industriellen Biotechnologie. Sowohl auf der metabolischen (beispielsweise Zamboni et al., 2003 und 2004) als auch auf der genetischen Ebene (Hümbelin et al., 1999; Perkins et al., 1999) wurden Untersuchungen zur Produktivität dieses Stamms gemacht. Im Rahmen von prozesstechnischen Untersuchungen wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Maßstabsverkleinerung in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab gelegt (Knorr et al., 2007). Dabei war die Kristallisation des Riboflavins im Medium und die Schaumbildung eine besondere Herausforderung für den kleinen Maßstab, da diese den Sauerstoffeintrag in das Medium verschlechtern konnten. Bei geeigneter Prozessführung beschleunigen die Untersuchungen im Millilitermaßstab dabei sowohl die Suche nach geeigneten Stämmen (Vester et al., 2009a) als auch die weitere Prozessentwicklung. Die Riboflavinproduktion stellt dabei ein Beispiel für den Stand der Technik bei der Nutzung von parallelen Milliliterrührkesselreaktoren für die Optimierung von Satzmedien dar. Die Verwendung dieses Maßstabs zur Entwicklung neuer Zulaufmedien im Parallelansatz würde dabei eine Prozessoptimierung weiter beschleunigen.

Im industriellen Riboflavinproduktionsprozess mit *B. subtilis* erfolgt die Zufuhr des Stickstoffs über das Titrationsmittel Ammoniumhydroxyd (Knorr et al., 2005; Vester et al., 2007a). Für Kultivierungen im Millilitermaßstab wurde diese Prozessführung auf die Verwendung von NaOH als Titrationsmittel und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle im Zulaufmedium umgestellt (Vester, 2009b), die Stickstoffdosierung jedoch nicht weiter optimiert. Aus diesem Grund wird beispielhaft für vier verschiedene Satzmedien der Einfluss der Reduzierung der Stickstoffdosierung auf die Riboflavinausbeute betrachtet. Diese soll sowohl mit einem intermittierenden Dosierprofil in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab, als auch mit einem kontinuierlichen Zulauf im Litermaßstab untersucht werden.

## 5.1 Ammoniumkonzentration im Zulaufmedium

Die Zulaufraten für den Riboflavinproduktionsprozess im Millilitermaßstab betragen für Glukose  $5,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und für Ammoniumsulfat  $1,55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Unter diesen Prozessbedingungen wurden im Millilitermaßstab zunächst vier verschiedene Satzmedien bezüglich Stickstoffversorgung und Riboflavinproduktion untersucht. Dabei wurden ein aus der Literatur bekanntes Referenzmedium (Knorr et al., 2007; Vester et al., 2009a) und drei Satzmedien („Gen2Ind6“, „Gen4Ind10“ und „Gen8Ind14“) aus einer Satzmedienoptimierung aus dem Millilitermaßstab verwendet (Vester, 2009b). Die Zulaufexperimente mit intermittierendem Dosierungsprofil mit einer Abtastrate von 10 min wurden jeweils in sechs parallelen Rührkesselreaktoren durchgeführt und sequenziell wiederholt. Neben den integralen Riboflavinausbeuten wurden die Ammoniumkonzentrationen in den Medien 24 h und 48 h nach Prozessbeginn gemessen (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Riboflavinproduktion im Millilitermaßstab**

Dargestellt sind (A) die integrale Riboflavinausbeute gegenüber Glukose und (B) die Ammoniumkonzentration im Medium für Prozesse mit vier unterschiedlichen Satzmedien jeweils nach 24 h (■) und 48 h (▣). Die Zulaufzeiten während der Prozesse betragen  $5,1 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $1,55 \text{ g}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die Ergebnisse setzen sich aus zwei sequenziellen Parallelansätzen mit jeweils sechs parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zusammen. Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurde in jeweils zwei parallelen Rührkesselreaktoren in den zwei sequenziellen Parallelansätzen durchgeführt.

Es war zu beobachten, dass mit dem Referenzmedium nach 24 h Prozesszeit mit  $0,029 \pm 0,002 \text{ g g}^{-1}$  eine höhere integrale Riboflavinausbeute erzielt werden konnte, als mit den übrigen drei Medien mit  $0,021 - 0,024 \text{ g g}^{-1}$ . Nach 48 h ließ sich wegen der hohen Standardabweichung der Referenzprozesse mit einer Ausbeute von  $0,032 \pm 0,006 \text{ g g}^{-1}$  kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen nach 24 h und den übrigen drei Produktionsprozessen nach 48 h messen. Diese wiesen hingegen nach 48 h Steigerungen gegenüber deren integralen Ausbeuten nach 24 h auf. Zudem waren zwischen den Riboflavinproduktionsprozessen signifikante Unterschiede mit  $0,028 \pm 0,001 \text{ g g}^{-1}$ ,  $0,030 \text{ g g}^{-1}$  und  $0,032 \pm 0,002 \text{ g g}^{-1}$  integraler Riboflavinausbeute erkennbar. Für die Ammoniumkonzentrationen in den Medien konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (Abbildung 5.1-B). Für die Kultivierungen mit dem Referenzmedium wurden nach 24 h mit  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  etwa zwei Drittel der Ammoniummenge der übrigen drei Prozesse gemessen. Nach

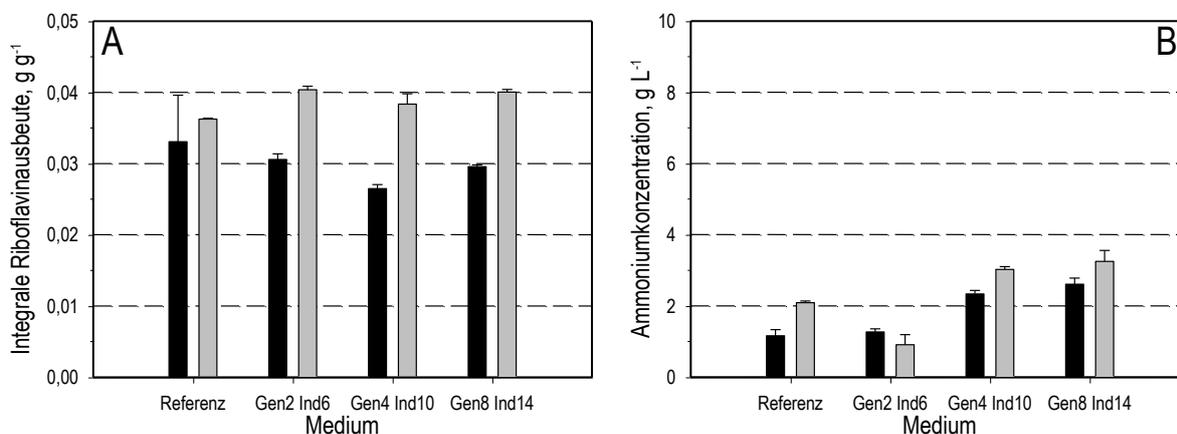
48 h Prozesszeit wurden in der Flüssigphase dieser drei Prozesse mit  $7,4 - 8,3 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium,  $\sim 20 - 30 \%$  höhere Konzentrationen im Vergleich zum Referenzprozesses bestimmt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse schien das Satzmedium sowohl auf die Ausbeuten als auch auf die Ammoniumkonzentration nach 48 h nur einen geringen Einfluss zu haben. Lediglich der geringere Stickstoffanteil von  $1,66 \text{ g L}^{-1}$  im Referenzmedium gegenüber den anderen Satzmedien mit Konzentrationen von  $5,6 - 7,8 \text{ g L}^{-1}$  hatten einen Effekt auf die gemessenen Ammoniumkonzentrationen.

Wegen der Anreicherung des Ammoniums in den Medien fand eine Reduzierung der Ammoniumsulfatzuläufe statt, wobei für die Satzmedien verschiedene Zulaufraten verwendet wurden (Tabelle 5.1). Die Riboflavinproduktionsprozesse wurden nun mit geändertem Zulaufmedium wiederholt (Abbildung 5.2).

**Tabelle 5.1: Stickstoffkonzentrationen in Zulaufmedien zur Riboflavinproduktion**

Medium	Stickstoffzulaufrate	Stickstoffkonzentration im Satzmedium
Startbedingung	$1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	/
Referenz	$0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1,66 \text{ g L}^{-1}$
Gen2 Ind6	$0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$5,62 \text{ g L}^{-1}$
Gen4 Ind10	$0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$7,84 \text{ g L}^{-1}$
Gen8 Ind14	$0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$5,71 \text{ g L}^{-1}$



**Abbildung 5.2: Riboflavinproduktion im Millilitermaßstab mit reduziertem Ammoniumsulfatzulauf**

Dargestellt sind (A) die integrale Riboflavinausbeute gegenüber Glukose und (B) die Ammoniumkonzentration im Reaktor für Prozesse mit vier verschiedene Satzmedien jeweils nach 24 h (■) und 48 h (▒). Die Zulaufraten während der Prozesse betragen  $5,1 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und variierten für den Ammoniumsulfatzulauf zwischen den Medien (Tabelle 4.8). Die Ergebnisse setzen sich aus zwei sequenziellen Prozessen mit jeweils sechs parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zusammen. Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurde in jeweils zwei parallelen Rührkesselreaktoren in den zwei sequenziellen Prozessen durchgeführt.

Durch die Änderungen der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulaufmedium konnte eine Steigerung der integralen Riboflavinausbeuten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h für alle Prozesse erreicht werden. Prozesse mit dem Referenzmedium hatten nach 24 h eine integrale Riboflavinausbeute von  $0,033 \pm 0,07 \text{ g g}^{-1}$  und nach 48 h von  $0,036 \pm 0,0001 \text{ g g}^{-1}$ . Damit war

für diesen Prozess eine Steigerung gegenüber dem Prozess mit dem ursprünglichen Zulaufmedium erkennbar (Abbildung 5.1). Die Prozesse mit den übrigen Satzmedien zeigten nach 24 h ebenfalls Steigerungen von 22 – 46 % gegenüber den Prozessen mit dem zuvor verwendeten Zulaufmedium und wiesen auch nach 48 h noch vergleichbare Verbesserungen auf. Damit wurden nach 48 h Prozesszeit integrale Riboflavinausbeuten von  $0,38 - 0,04 \text{ g g}^{-1}$  in den Prozessen mit diesen drei Satzmedien erreicht. Die Ammoniumkonzentrationen in den Medien waren im Gegensatz zu den vorangegangenen Prozessen mit  $0,9 - 3,2 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h verringert. Zudem war zwischen 24 h und 48 h nur ein geringer Anstieg in den Konzentrationen messbar. Im Referenzprozess reicherte sich das Ammonium bis 48 h Prozesszeit bis auf  $2,1 \text{ g L}^{-1}$  an. Für den Prozess mit dem Satzmedium „Gen2Ind6“ war eine Reduktion des Ammoniums im Medium von  $1,3 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  nach 24 h auf  $0,9 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h zu messen. Im Prozess mit Medium „Gen8Ind14“ wurde nach 48 h mit  $3,2 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Ammoniumkonzentration bestimmt. Damit zeigten die Ammoniumkonzentration nach 48 h noch 13 – 40 % der Konzentrationen von den vorangegangenen Prozessen im Millilitermaßstab.

Es wurde also weiterhin in allen Prozessen im Millilitermaßstab – mit Ausnahme von denen mit Satzmedium „Gen2Ind6“ – eine Zunahme der Ammoniumkonzentration von 24 h bis 48 h beobachtet. Der Ammoniumsulfatzulauf war für die Prozesse mit dem Satzmedium „Gen2Ind6“ jedoch um den Faktor zwei gegenüber den anderen Prozessen reduziert. Die Prozesse mit dem Referenzmedium zeigten mit einer Steigerung der Ammoniumkonzentration von 180 % von 24 h bis 48 h die höchste Konzentrationszunahme im Medium. Die Prozesse mit den Medien „Gen4Ind10“ und „Gen8Ind14“, die  $7,84 \text{ g L}^{-1}$  und  $5,71 \text{ g L}^{-1}$  Stickstoff im Satzmedium enthielten, hatten mit einem vergleichbaren Zulauf auch nahezu identische Ammoniumkonzentrationen nach 48 h. Aufgrund des hohen Stickstoffanteils im Satzmedium wurden in diesen Prozessen nach 48 h Kultivierung jedoch höhere Ammoniummengen als mit dem Referenzmedium bestimmt.

Insgesamt konnten durch die Reduzierung des Ammoniumsulfatzulaufs die Ammoniumkonzentrationen in den Medien der Prozesse reduziert werden. Zudem konnten die integralen Riboflavinausbeuten in den Prozessen gesteigert werden. Alles in allem ließ sich trotz des verwendeten intermittierenden Zulaufs ein eindeutiger Einfluss der Ammoniumsulfatzulauftrate erkennen.

## **5.2 Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

Die Maßstabsübertragung sowohl aus dem Litermaßstab in den Millilitermaßstab, als auch umgekehrt, war bereits mit dem Referenzmedium untersucht worden, ohne dass eine direkte Übertragbarkeit der Riboflavinausbeute möglich war (Knorr, 2005).

Die in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab untersuchten Ergebnisse zur intermittierenden Stickstoffdosierung wurden im Litermaßstab mit kontinuierlicher Dosierung überprüft. Hierfür wurden die acht Prozessbedingungen mit den gleichen Satz- und Zulaufmedien aber auf den Litermaßstab angepassten Prozessparametern untersucht (Tabelle 5.2).

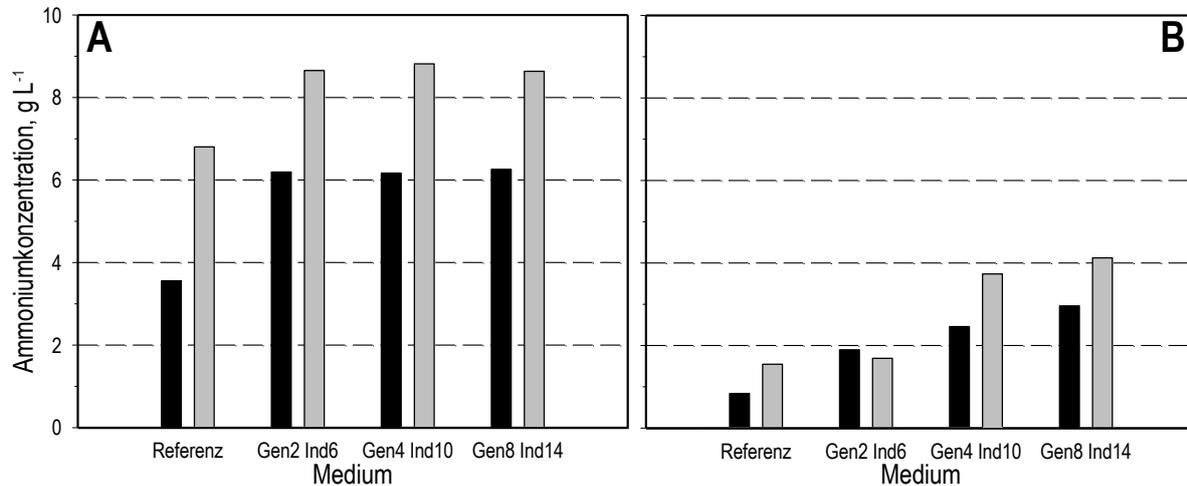
**Tabelle 5.2: Prozessparameter für Riboflavinproduktionsprozesse im Rührkesselreaktor**

Parameter	Millilitermaßstab	Litermaßstab
Rührerdrehzahl	2700 min <sup>-1</sup>	800 - 1500 min <sup>-1</sup>
Volumetrischer Leistungseintrag	15,3 W L <sup>-1</sup>	5,5 - 35,9 W L <sup>-1</sup>
Begasungsrate	4,8 L min <sup>-1</sup> (in alle Reaktoren)	1,17 - 2 vvm
pO <sub>2</sub> -Bereich	>15%	>15%
Sicherstellung der O <sub>2</sub> -Versorgung	Zugabe von Sauerstoff (0,0 - 2,4 L min <sup>-1</sup> )	Rührerdrehzahl und Überdruck im Reaktor (0,2 - 0,6 bar)
Zugabe von Zulaufmedium	Intermittierend (Abtastzeit 10 min)	kontinuierlich

Der volumetrische Leistungseintrag  $P \cdot V^{-1}$  von 15,3 W L<sup>-1</sup> im Millilitermaßstab wurde im Litermaßstab zwischen 5,5 und 35,9 W L<sup>-1</sup> verändert, um neben dem Überdruck in dem Rührkesselreaktor eine ausreichende Sauerstoffversorgung von > 15 % in der Flüssigphase zu gewährleisten. Als weitere Änderungen wurde im Litermaßstab die Zuluft nicht mit Sauerstoff angereichert und der Zulauf wurde kontinuierlich zugeführt. Dies war ein Unterschied zum Millilitermaßstab, in dem Zulaufmedium und Korrekturmittel nur intermittierend mit einer Abtastzeit von 10 min dosiert werden konnten. Die Volumenzunahme während der Zulaufprozesse, war trotz der leicht unterschiedlichen Längen der Satzphasen für die verschiedenen Medien, nur minimal unterschiedlich und lag in beiden Maßstäben bei  $\sim 1,15 V_{\text{Ende}} V_{\text{Start}}^{-1}$  für 24 h und  $1,45 V_{\text{Ende}} V_{\text{Start}}^{-1}$  nach 48 h.

Für alle Zulaufprozesse wurden wiederum die Ammoniumkonzentrationen und integralen Riboflavinausbeuten nach 24 h und 48 h bestimmt. In Abbildung 5.3 sind die Ammoniumkonzentrationen in den Medien mit dem ursprünglichen und dem reduzierten Ammoniumsulfatzulauf dargestellt. Nach 48 h hatte der Referenzprozess mit dem ursprünglichen Ammoniumsulfatzulauf von 1,55 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> eine Ammoniumkonzentration von 6,8 g L<sup>-1</sup> im Medium, die mit der Konzentration von  $6,2 \pm 0,6$  g L<sup>-1</sup> im Millilitermaßstab vergleichbar war. Für Prozesse mit den übrigen drei Satzmedien ließen sich wie im Millilitermaßstab  $\sim 6$  g L<sup>-1</sup> Ammonium nach 24 h und 8,6 – 8,8 g L<sup>-1</sup> nach 48 h messen. Auch für die Prozesse mit reduziertem Ammoniumsulfatzulauf waren die Ergebnisse zwischen den Maßstäben vergleichbar. Für den Referenzprozess war nach 48 h eine Reduzierung der Ammoniumkonzentration um 29 % gegenüber dem Millilitermaßstab auf 1,5 g L<sup>-1</sup> festzustellen. Für die Riboflavinproduktion mit dem Satzmedium „Gen2Ind6“ wurde unter diesen Bedingungen wie im Millilitermaßstab eine abnehmende Ammoniumkonzentration im

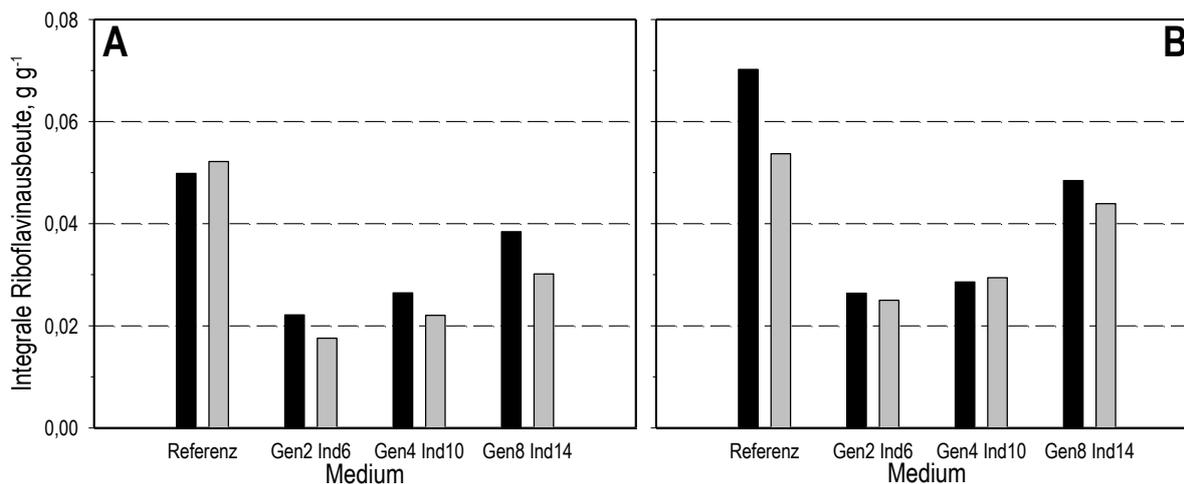
Medium von 24 h bis 48 h gemessen. Die Konzentration war jedoch mit  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  zum Ende des Prozesses doppelt so hoch wie im Millilitermaßstab. Die übrigen beiden Satzmedien waren wiederum untereinander vergleichbar, zeigten aber mit  $3,71 \text{ g L}^{-1}$  und  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  etwa 25 % höhere Stickstoffkonzentrationen als im Millilitermaßstab.



**Abbildung 5.3: Ammoniumkonzentrationen bei der Riboflavinproduktion im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

Die Ammoniumkonzentrationen für Prozesse im Litermaßstab mit den vier verschiedenen Satzmedien mit dem ursprünglichen Ammoniumsulfatzulauf (A) und dem reduzierten Ammoniumsulfatzuläufen (B). Die Ammoniumkonzentration wurde jeweils nach 24 h (■) und 48 h (▒) im Medium bestimmt.

Im Gegensatz zu den Ammoniumkonzentrationen, die zwischen den Maßstäben vergleichbar waren, zeigten die integralen Riboflavinausbeuten stärkere Abweichungen zu den Ergebnissen im mit intermittierender Dosierung des Zulaufmediums (Abbildung 5.4). Für die intermittierende Dosierung wurde unter allen Bedingungen eine ansteigende integrale Riboflavinausbeute von 24 h zu 48 h gemessen, wohingegen im Litermaßstab bei nahezu allen Produktionsprozessen eine Abnahme in der Ausbeute zwischen diesen beiden Zeitpunkten feststellbar war. Durch die Reduzierung des Ammoniumsulfatzulaufs konnten die Ausbeuten nach 48 h gegenüber der ursprünglichen Stickstoffdosierung gesteigert werden.

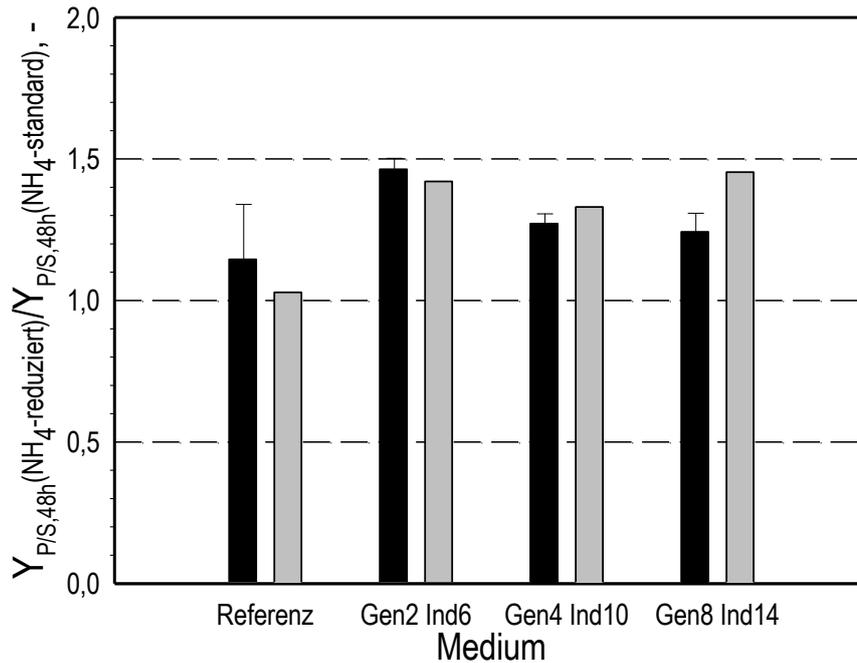


**Abbildung 5.4: Vergleich der integralen Riboflavinausbeute im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

Die integrale Riboflavinausbeute für Prozesse im Litermaßstab mit den vier verschiedenen Satzmedien mit dem ursprünglichen Ammoniumsulfatzulauf (A) und dem reduziertem Ammoniumsulfatzulauf (B). Die Ausbeuten wurden jeweils nach 24 h (■) und 48 h (□) im Medium bestimmt.

Bei der detaillierten Betrachtung der Prozesse zeigte das Referenzmedium wiederum andere Ergebnisse, als die übrigen drei Medien. Mit diesem wurde mit dem ursprünglichen Zulaufmedium eine integrale Riboflavinausbeute von  $0,052 \text{ g g}^{-1}$  nach 48 h bestimmt und damit das Ergebnis aus dem Millilitermaßstab um 63 % übertroffen. Für die Prozesse mit den übrigen drei Satzmedien waren die Riboflavinausbeuten mit  $0,018 \text{ g g}^{-1}$  für das Medium „Gen2Ind6“ bis  $0,030 \text{ g g}^{-1}$  für das Medium „Gen8Ind14“ im Litermaßstab schlechter als im Millilitermaßstab. Durch die Reduzierung des Ammoniumsulfatzulaufs lag die Riboflavinausbeute mit dem Referenzmedium nach 48 h bei  $0,054 \text{ g g}^{-1}$ , was eine Steigerung um 50 % gegenüber dem Prozess im Millilitermaßstab bedeutete. Die integralen Ausbeuten für das Medium „Gen2Ind6“ und „Gen4Ind10“ wurden zwar durch die Reduzierung der Stickstoffdosierung auf  $0,025 \text{ g g}^{-1}$  und  $0,029 \text{ g g}^{-1}$  gesteigert, lagen damit aber immer noch 38 % und 24 % unter den Ausbeuten aus dem Millilitermaßstab. Für das Satzmedium „Gen8Ind10“ war hingegen die Riboflavinausbeute mit  $0,044 \text{ g g}^{-1}$  mit den Ausbeuten aus dem Milliliterprozess vergleichbar.

Die Unterschiede der integralen Riboflavinausbeuten für die intermittierende und die konstante Dosierung ließen eine direkte Übertragung der im Millilitermaßstab gewonnenen Ergebnisse nicht zu. Für eine Nutzung der Daten aus dem Millilitermaßstab zur Optimierung der Prozessführung im Litermaßstab wurde daher eine Korrelation erstellt. Hierfür wurden die Veränderungen der integralen Riboflavinausbeute zwischen dem ursprünglichen Zulaufmedium und dem modifizierten Zulauf nach 48 h miteinander verglichen (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5: Steigerung der integralen Riboflavinausbeuten nach 48 h im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab**

Dargestellt sind die Veränderungen der integralen Riboflavinausbeuten ( $Y_{P/S}(\text{reduziert})/Y_{P/S}(\text{standard})$ ) nach 48 h für Milliliter- (■) und Litermaßstab (■) bei Verwendung unterschiedlicher Zulaufmedien.

Die Steigerungen der integralen Riboflavinausbeuten nach 48 h durch eine Reduktion des Ammoniumsulfats im Zulaufmedium waren zwischen den Maßstäben im Rahmen der gemessenen Fehler vergleichbar. Bei der Referenz kam es im Litermaßstab, aufgrund einer schlechteren Riboflavinproduktion mit dem reduzierten Ammoniumsulfatzulauf nach 24 h, nur zu einer geringeren Steigerung der Ausbeute von 103 % gegenüber 115 % im Millilitermaßstab. Aufgrund der großen Standardabweichung im Millilitermaßstab waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant. Die Steigerungen, die für die Prozesse mit den Satzmedien „Gen2Ind6“ und „Gen4Ind10“ beobachtet wurden, waren in beiden Maßstäben mit < 5% Unterschied nahezu identisch. Nur für das Medium „Gen8Ind14“ wurde im Litermaßstab eine größere Steigerung der Ausbeute mit 145 % gegenüber 124 % im Millilitermaßstab erzielt.

### Diskussion

Die integrale Riboflavinausbeute der Referenzprozesse mit intermittierendem Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab war mit  $0,032 \pm 0,006 \text{ g g}^{-1}$  etwas geringer als bei Prozessen, bei denen der Stickstoff über Ammoniumhydroxyd zugefügt wurde. Für diese Prozessführung mit dem gleichen Stamm wurden Ausbeuten von  $0,039 \text{ g g}^{-1}$  (Knorr, 2005), sowie  $0,033 \text{ g g}^{-1}$  und  $0,034 \text{ g g}^{-1}$  (Vester, 2009b) nach 48 h im Millilitermaßstab erreicht. Durch die Reduzierung der Stickstoffdosierung konnte die integrale Riboflavinausbeute auf

$0,036 \pm 0,0001 \text{ g g}^{-1}$  gesteigert werden und war damit mit den Ergebnissen von Knorr (2005) und Vester (2009b) vergleichbar.

Die relative Standardabweichung zwischen den Riboflavinproduktionsprozessen in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab lag bei  $\leq 6 \%$  und damit in dem von Vester et al. (2009a) beschriebenen Rahmen. Lediglich die Ergebnisse für das Referenzmedium mit Standardstickstoffdosierung waren mit  $19 \%$  ungewöhnlich hoch. Für die Produktionsprozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab konnten die relativen Standardabweichungen nicht bestimmt werden, wurden aber in Voruntersuchungen auf  $4 - 5 \%$  bestimmt (Vester et al., 2009a). Damit würden 5 parallele Produktionsprozesse ausreichen, um signifikante Unterschiede der Prozessbedingungen von  $10 \%$  zu erkennen (Vester et al., 2009a).

Für das Referenzmedium ließen sich für die Standardstickstoffdosierung  $6,2 \text{ g L}^{-1}$  und  $6,8 \text{ g L}^{-1}$  und für die reduzierte Dosierung  $2,1 \text{ g L}^{-1}$  und  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium in den Medien der Rührkesselreaktoren im Milliliter beziehungsweise Litermaßstab nach 48 h messen. Die integralen Riboflavinausbeuten des Referenzmediums im Litermaßstab waren nach 24 h hingegen mehr als doppelt so hoch und lagen auch nach 48 h noch bei  $140 - 160 \%$  der Ausbeuten, die im Millilitermaßstab erreicht wurden. Da die Betriebskenngrößen des Zulaufs, bis auf die intermittierende Zufuhr im Millilitermaßstab, identisch waren, lag die Vermutung nahe, dass es einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Maßstäben gibt. Knorr (2005) konnte zeigen, dass die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Zuluft eine Reduzierung der Biomassekonzentration mit sich bringt. Weiterhin wurden im Litermaßstab mit kontinuierlichem Zulauf und ohne die Anreicherung der Zuluft mit reinem Sauerstoff bessere Ausbeuten als im Millilitermaßstab gemessen (Knorr, 2005, Vester 2009b). Zudem muss beachtet werden, dass das Referenzsatzmedium im Litermaßstab auf die dortigen Prozessbedingungen optimiert wurde. Die übrigen drei Satzmedien wurden hingegen auf die Prozessführung im Millilitermaßstab mit dem intermittierenden Zulauf mit Stickstoffdosierung optimiert.

Der generelle Einfluss des Ammoniums auf den Prozess hängt dabei unter anderem von den komplexen Stickstoffquellen ab. Glutamin ist für *Bacillus spp.* die bevorzugte Stickstoffquelle, da dieses nach der Umwandlung in Glutamat durch die Zellen direkt in der weiteren Aminosäure- und Nukleotidsynthese verwendet werden kann (Detsch und Stülke, 2003, Jürgen et al., 2005). Nach dem Verbrauch von Glutamin und weiteren Aminosäuren aus dem Medium ist Ammonium die gegenüber anderen anorganischen Verbindungen am häufigsten genutzte Stickstoffquelle von *Bacillus*. Ammonium kann dabei in Form von Ammoniak direkt in die Zellen diffundieren, muss als Ammoniumion jedoch mittels eines Transporters in die Zellen aufgenommen werden (Detsch und Stülke, 2003). Das Gleichgewicht zwischen Ammoniak und dem Ammoniumion wird dabei aber erst bei basischem pH ( $\text{pK}_s = 9,2$ ) und hohen Konzentrationen in Richtung des Ammoniaks verschoben. Leejeerajumnean et al. (2000) zeigten, dass bei pH 7 auch bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von  $60 \text{ g L}^{-1}$ , was einer Konzentration von  $16,8 \text{ g L}^{-1}$

Ammonium entsprach, keine Inhibierung des Wachstums von *B. subtilis* zu beobachten war. Durch eine Erhöhung des pH auf pH 9 und der damit verbundenen Erhöhung des Ammoniakanteils im Medium konnte jedoch nur noch bei wenigen der untersuchten *Bacillus* Stämme ein Wachstum beobachtet werden.

Srivastava und Wangikar (2008) beobachteten zudem für *B. pumilis*, dass sich bei Ammoniumsulfatkonzentrationen höher als  $5 \text{ g L}^{-1}$  ( $\sim 1,4 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium) die Produktion von D-Ribose auf Grund von vermehrt auftretenden Nebenprodukten wie Acetat und Acetoin verschlechterte.

Weiterhin hat Ammoniumsulfat im Gegensatz zu anderen Stickstoffquellen den Nachteil, dass während des Verbrauchs der pH sinkt (Wu et al., 2007). Dabei erhöhen die freigesetzten Sulfatanionen und das zugegebene Korrekturmittel die Ionenkonzentration und damit die Osmolarität im Medium. Dies kann wiederum einen negativen Einfluss auf das Wachstum und die Produktivität der Zellen haben (Boch et al., 1994).

In den Riboflavinproduktionsprozessen wurden sowohl mit der intermittierenden, als auch mit der kontinuierlichen Stickstoffdosierung mit dem Standardzulaufmedium Ammoniumkonzentrationen von über  $5 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Dies kann sowohl zu nicht bestimmten Nebenprodukten geführt haben, als auch aufgrund der Änderungen im Medium zu einer Einschränkung der Produktivität. Durch die Reduzierung der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulaufmedium konnten die gemessenen Konzentrationen auf unter  $5 \text{ g L}^{-1}$  reduziert werden. Gleichzeitig konnte aus den oben beschriebenen Gründen eine Steigerung der integralen Riboflavinausbeute beobachtet werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass bei der Verwendung des Referenzmediums trotz höherer Ammoniumsulfatzulaufraten eine geringere Ammoniumanreicherung im Medium stattfand, als bei den übrigen Medien, die bereits mehr Stickstoff in Form von komplexen Bestandteilen im Satzmedium hatten. Der Anteil komplexer Stickstoffe in den Satzmedien, der von *B. subtilis* bevorzugt verwendet wird, muss also zuerst aufgebraucht werden, bevor Ammonium verstoffwechselt wird. Wird zu diesem Zeitpunkt bereits Ammonium in das Medium zugeführt, so reichert sich dieses im Medium an und führt bei zu hohen Konzentrationen zu einer Inhibierung der Produktion und des Wachstums.

Ein Einfluss der Satzmedien auf den pH des Prozesses wurde von Vester (2009b) festgestellt. Dabei zeigten hohe Konzentrationen an komplexen Stickstoffquellen einem Anstieg des pH im Medium auf bis zu pH 7,8 (Vester, 2009b). Dieser Anstieg begann nach dem Ende der Satzphase, so dass der pH wegen der nicht vorhandenen Säuretitation bis zu 20 h über dem gewünschten pH 6,8 blieb. Dabei wird besonders der Aufschluss von Harnstoff, Casein oder Hefeextrakt für ein Ansteigen des pH im Medium verantwortlich gemacht (Raimbault, 1980). Auch diese Abweichung von dem für den Prozess idealen pH von pH 6,8 hat negative Auswirkungen auf die Produktivität.

Durch die Nutzung des Parallelansatzes konnten innerhalb kurzer Zeit Inhibierungen der Riboflavinproduktion durch die verwendeten Stickstoffdosierungen aufgezeigt werden. Die Unterschiede in der Prozessführung, also die Dosierung von Zulaufmedium (intermittierend

und kontinuierlich) und die Sicherstellung der Sauerstoffversorgung (Überlagerung mit reinem Sauerstoff gegenüber Änderung von Leistungseintrag und Überdruck) ließen eine direkte Übertragbarkeit der absoluten Ergebnisse zwischen den Maßstäben nicht zu. Obwohl die Ammoniumkonzentrationen in den Medien zwischen den beiden Dosierungen und Maßstäben vergleichbar waren, unterschieden sich die integralen Riboflavinausbeuten. Diese Unterschiede waren jedoch nicht systematisch, sondern waren mit dem verwendeten Satzmedium verknüpft. Dabei wurde mit dem Referenzmedium im Rührkesselreaktor im Litermaßstab eine bessere Ausbeute erreicht als im Millilitermaßstab, wohingegen mit den Satzmedien „Gen2Ind6“ und „Gen4Ind10“ im Millilitermaßstab bessere Ergebnisse erzielt wurden. Die relativen Änderungen der integralen Riboflavinausbeuten waren wiederum unabhängig von der Art der Dosierung (intermittierend im Millilitermaßstab und kontinuierlich im Litermaßstab, Abbildung 5.5). Damit konnte gezeigt werden, dass die Nutzung des Parallelansatzes für Untersuchungen zur Stickstoffdosierung für den Riboflavinproduktionsprozess im Zulaufverfahren geeignet ist.

## **6 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Produktion von Hemicellulasen mit *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 im Zulaufverfahren**

Für die Produktion von Hemicellulasen (Xylanasen) werden im kommerziellen Maßstab vor allem Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Trichoderma* genutzt (Saha et al., 2009). Bei der Produktion werden als Substrate häufig Feststoffe wie Lignocellulose oder Hemicellulose sowie lösliche Substrate wie Xylan eingesetzt (Kulkanari et al., 1999, Polizeli et al., 2005; Techapun et al., 2003). Während des Wachstums dieser Mikroorganismen kommt es durch die morphologische Veränderung der Pilze zu einer Erhöhung der Viskosität der Flüssigphase. Aus diesem Grund werden an den Bioreaktor hohe Anforderungen für den Sauerstofftransport in die Flüssigphase gestellt. Besonders die Gattung *Aspergillus* zeichnet sich zudem durch ein starkes Wachstum an den Wänden und Einbauten der Reaktoren aus (Larsen et al., 2004). Diese Charakteristik stellt bei der Maßstabsverkleinerung, bei der sich vor allem auch das Oberfläche-Volumenverhältnis ändert, eine besondere Herausforderung dar. Der auf diese Besonderheiten ausgelegte Paddelrührer für die Milliliterührkesselreaktoren (Hortsch et al., 2010a), sollte deshalb für die Kultivierung von *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 genutzt werden. Das Rührorgan gewährleistet durch eine hohe Phasengrenzfläche und eine Oberflächenbegasung eine ausreichende Sauerstoffversorgung in der Flüssigphase.

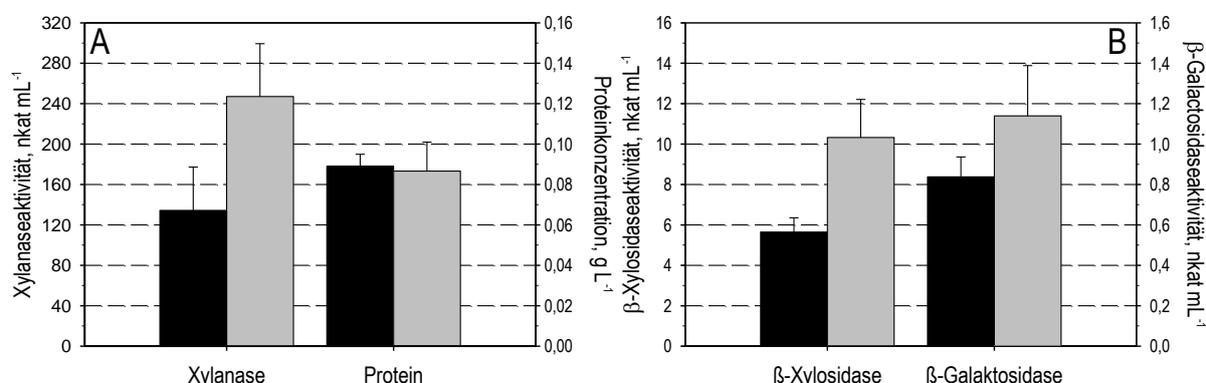
Für die Durchführung der Zulaufoptimierung zur Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* werden zuerst ausgewählte Prozessbedingungen im Schüttelkolben und die Reproduzierbarkeit der Enzymproduktion in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab überprüft. Mit Hilfe einer statistischen Versuchsplanung wird nachfolgend die Optimierung eines Zulaufmediums mit drei Bestandteilen durchgeführt. Abschließend werden ausgewählte Bedingungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab weiter untersucht.

## 6.1 Voruntersuchungen

Der Einfluss der Prozessvariablen pH und Temperatur und der drei Zuckerarten (Glukose, Laktose und Maltose) auf die Xylanaseproduktion wurde zu Voruntersuchungen im Schüttelkolben experimentell untersucht. Diese Kenngrößen sollten im Rahmen der Optimierung nicht abgedeckt werden, zeigen aber einen Einfluss auf die Produktivität.

Der pH in den Medien wurde mit einem 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 5 stabilisiert, wodurch ein pH von pH ~5,9 erreicht wurde.

Neben dem pH musste die Kultivierungstemperatur festgelegt werden. Dabei sollte in 96 h Prozesszeit eine möglichst effiziente Wachstums- und Produktionsphase ermöglicht werden. Der Einfluss einer Senkung der Kultivierungstemperatur auf 28 °C nach 24 h Prozesszeit ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

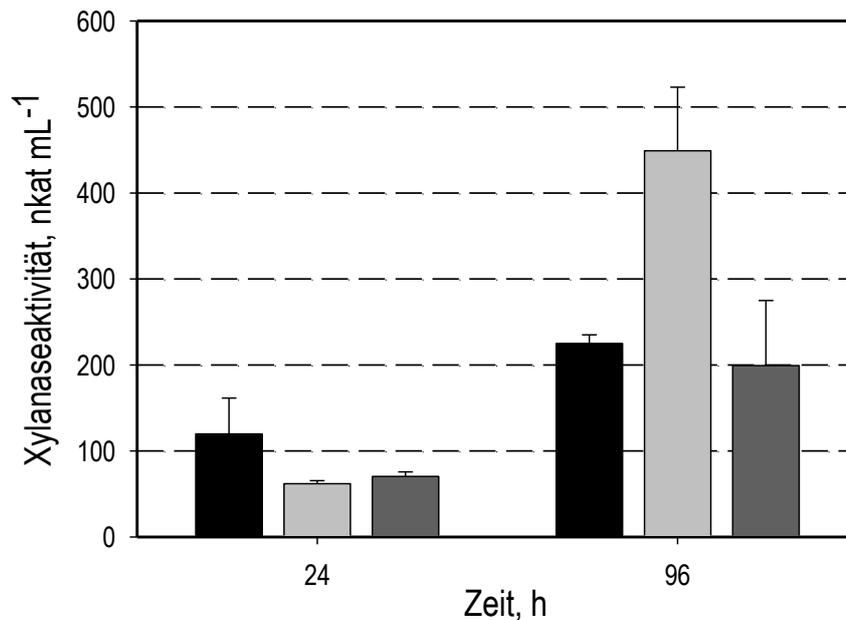


**Abbildung 6.1: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die Ergebnisse von Kultivierungen bei 30 °C (■) und 28 °C (□) aus jeweils sechs Schüttelkolben. Die Schüttelkolben wurden nach der Inokulation für 24 h bei 30 °C und dann weitere 72 h bei 30 °C beziehungsweise 28 °C inkubiert. Dabei sind die Xylanaseaktivität und die Proteinkonzentration im Überstand (A) und die Aktivität der β-Xylosidase gegenüber pNPX und der β-Galactosidase gegenüber pNPGal (B) dargestellt.

Durch eine Senkung der Temperatur nach 24 h konnte die Xylanaseaktivität um 68 % auf  $247 \pm 52 \text{ nkat mL}^{-1}$  gegenüber dem ursprünglichen Prozess bei konstanter Temperatur gesteigert werden. Die Proteinkonzentration zeigte keine signifikanten Änderungen und lag für beide Betriebsweisen bei  $\sim 0,9 \text{ g L}^{-1}$ . Dagegen wiesen die Aktivitäten der 1,4-β-D-Xylan Xylohydrolase (β-Xylosidase) gegenüber dem Substrat *p*-Nitrophenyl β-D-Xylopyranoside (pNPX) und die β-D-Galactosidase (β-Galactosidase) gegenüber *p*-Nitrophenyl β-D-Galactopyranoside (pNPGal) ebenfalls signifikante Aktivitätssteigerungen auf: Steigerung um 84 % und 35 % gegenüber der Betriebsweise mit konstanter Temperatur (Abbildung 6.1-B). Für die weiteren Prozesse wurde nun eine Verringerung der Reaktionstemperatur auf 28 °C nach 24 h genutzt.

Für die angestrebte Optimierung mit *A. aculeatus* DSM 2344 wurde sowohl in der Satzphase als auch in der Zulaufphase ein löslicher Zucker als schnell verwertbare Kohlenstoffquelle verwendet. Aus diesem Grund war der Einfluss dieser Zucker auf die Xylanaseproduktion von besonderem Interesse (Abbildung 6.2).

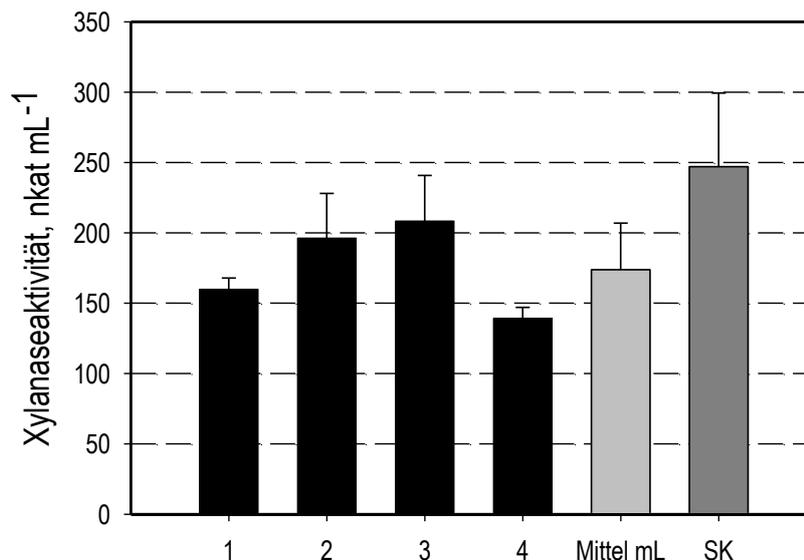


**Abbildung 6.2: Einfluss löslicher Zucker auf die Xylanaseaktivität von *A. aculeatus***

Dargestellt ist der Einfluss von Laktose (■), Glukose (□) und Maltose (▒) im Satzmedium auf die Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344 nach 24 und 96 Stunden. Die Schüttelkolben wurden für 24 h bei 30 °C und anschließend 28 °C und 200 min<sup>-1</sup> in Schüttelkolben betrieben. Die Ergebnisse setzen sich aus jeweils drei parallelen Schüttelkolbenexperimenten zusammen.

Den Satzmedien wurden die Zucker mit einer Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup> zu Beginn des Prozesses zugegeben. Nach 24 h konnte so der Effekt des Zuckers auf die Produktivität und nach 96 h der Langzeiteffekt auf den Prozess beobachtet werden. Mit Laktose im Medium wurde mit 119 ± 42 nkat mL<sup>-1</sup> nach 24 h eine signifikant höhere Xylanaseaktivität als für Glukose oder Maltose im Medium beobachtet, bei denen 62 nkat mL<sup>-1</sup> und 70 nkat mL<sup>-1</sup> bestimmt wurden. Nach 96 h Prozesszeit wiesen Schüttelkolben mit Glukose im Satzmedium mit 449 ± 74 nkat mL<sup>-1</sup> die höchste Aktivität auf. Damit war die gemessene Xylanaseaktivität mit Glukose doppelt so hoch, wie bei Verwendung der anderen Zucker.

Generell ist bei der Kultivierung von morphologisch veränderbaren Organismen die Varianz zwischen einzelnen Prozessen höher, als bei einzelligen Mikroorganismen. Die Reproduzierbarkeit von Satzprozessen mit *A. aculeatus* in sechs parallelen Schüttelkolben und von 13 sequenziell betriebenen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab wurde untersucht (Abbildung 6.3). Dabei wurden in den parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab relative Standardabweichungen von 5 – 16 % in der Xylanaseaktivität nach 96 h gemessen. Sechs parallele Schüttelkolben zeigten eine Abweichung von 21 %. Das Mittel über alle 13 Rührkesselreaktoren in vier sequentiellen Ansätzen wies mit einer relativen Standardabweichung von 19 % vergleichbare Reproduzierbarkeiten auf. Im Millilitermaßstab wurden jedoch durchschnittlich mit 173,9 nkat mL<sup>-1</sup> nur 70 % der Xylanaseaktivität wie in den Schüttelkolben gemessen.



**Abbildung 6.3: Vergleich von Satzprozessen zur Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Verglichen wird die sequenzielle Reproduzierbarkeit der Xylanaseaktivität nach 96 h von Satzprozessen mit *A. aculeatus* DSM 2344 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab mit Kultivierungen im Schüttelkolben. Dabei sind Ergebnisse der Kultivierungen 1 und 2 aus jeweils vier, die Ergebnisse 3 aus zwei und 4 aus drei parallelen Rührkesselreaktoren (■) dargestellt. Zusätzlich wurde das Mittel aus den 13 sequenziell betriebenen Rührkesselreaktoren (□) mit von 6 parallelen Schüttelkolben (SK, ■) verglichen.

## 6.2 Optimierung

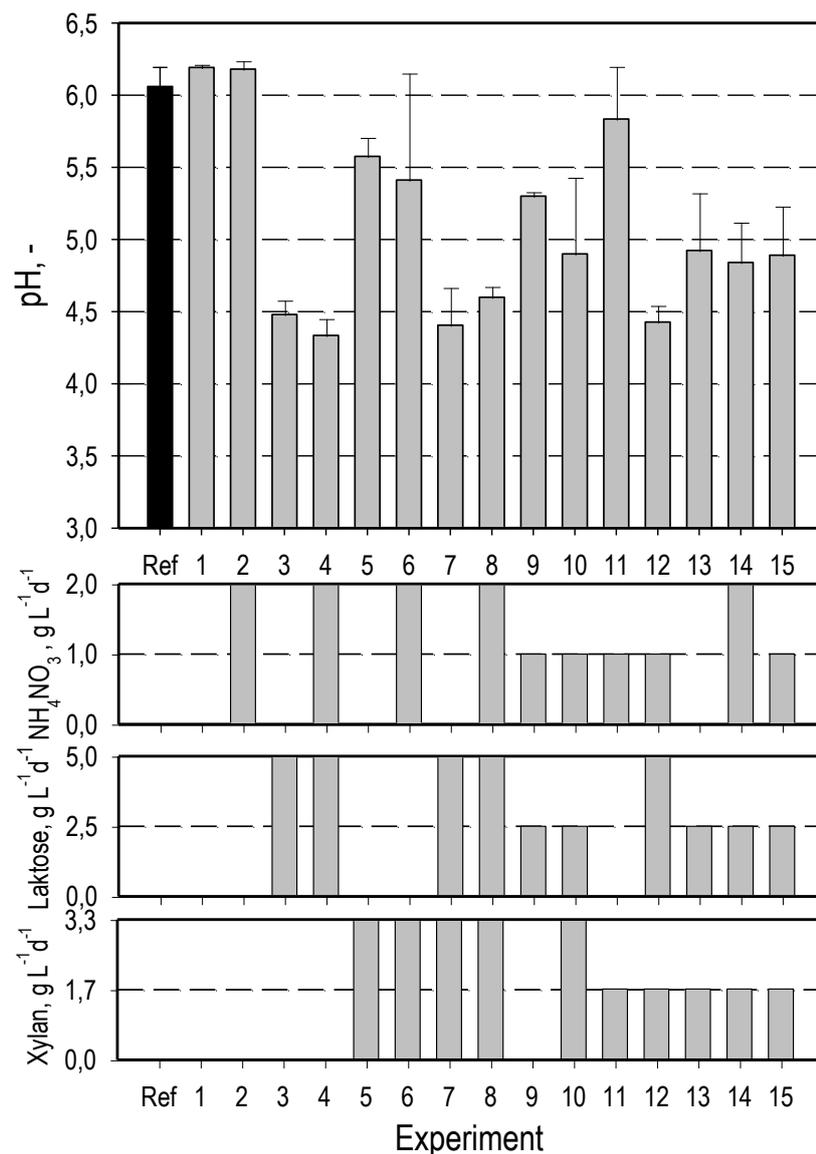
Aufbauend auf den Voruntersuchungen wurde eine Optimierung des Zulaufmediums für die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344 gestartet. Die Produktionsprozesse wurden in 12 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab durchgeführt. Der Zulauf wurde nach 24 h mit einer Abtastrate von 12 h in die Produktionsprozesse zugeführt. Für die Induktion der Produktion enthielt das Zulaufmedium Xylan. Neben diesem wurde ein leicht verstoffwechselbarer Zucker zugegeben. Durch die regelmäßige Zufuhr des Zuckers war vor allem der kurzzeitige Einfluss von Interesse, bei dem Laktose den besten Einfluss auf die Produktion zeigte (Abbildung 6.2). Als Stickstoffquelle diente Ammoniumnitrat im Zulaufmedium.

Ein quadratischer Polynomansatz (vgl. Kapitel 4.4) mit drei Variablen wurde für die Erstellung des experimentellen Plans verwendet. Hierfür mussten für die drei Variablen (Xylan, Laktose und Ammoniumnitrat) die Ober- und Untergrenze der gewünschten Zulaufmengen festgesetzt werden. Für die Untergrenze der zu untersuchenden Zulaufmengen wurde für alle drei Bestandteile  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  gewählt. Die Obergrenze lag für Xylan bei  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , für Laktose bei  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und für Ammoniumnitrat bei  $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die so festgelegten 15 experimentellen Bedingungen (Tabelle 4.22 und Tabelle 4.23) wurden in jeweils 3 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab untersucht und die Ergebnisse für die Parameteridentifikation des Polynoms zweiter Ordnung (Gleichung 4.5) verwendet.

Zur Optimierung des Zulaufmediums wurde für alle parallelen Rührkesselreaktoren eine gemeinsame Vorkultur verwendet. Dem Satzmedium wurden  $10 \text{ g L}^{-1}$  Laktose und der

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 5 zugegeben. Die Vorkultivierung wurde in drei parallelen Schüttelkolben über 24 h durchgeführt. Die parallelen Zulaufverfahren erfolgten über 72 h in den Milliliterrührkesselreaktoren. Zur Endpunktbestimmung wurden Proben für die Messung von Proteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten genommen. Zudem wurde die Biomassekonzentration im Medium bestimmt. Die Biomasse von der Reaktorwand und dem Rührorgan wurde abgenommen und in einem Reaktionsgefäß getrocknet und dessen Biotrockenmasse bestimmt.

Der nach 96 h Prozesszeit gemessene pH hatte jeweils nur geringe Abweichungen innerhalb der 3 Parallelansätze (Abbildung 6.4).

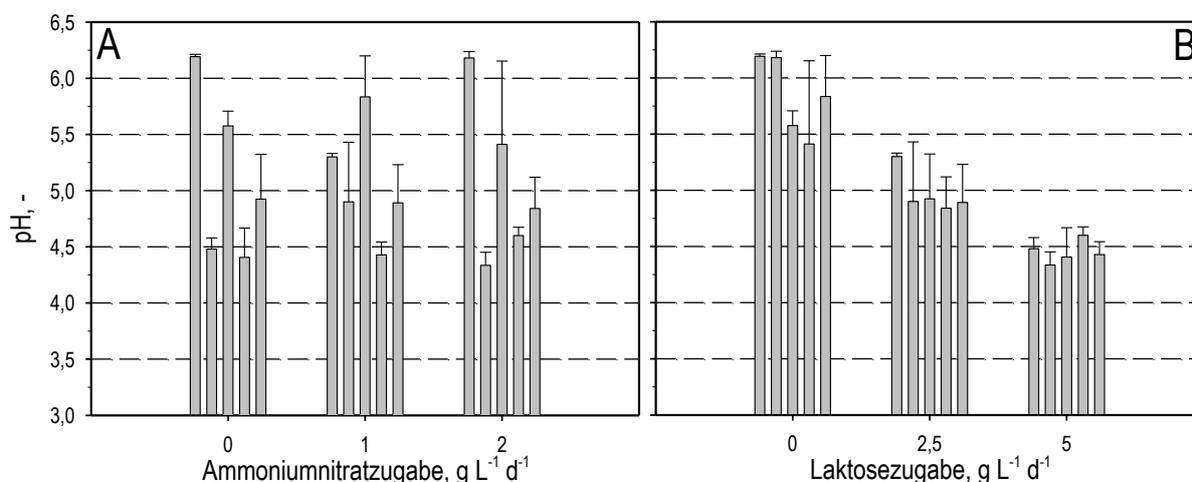


**Abbildung 6.4: Vergleich des pH für alle Experimente mit *A. aculeatus* DSM 2344 zur Optimierung der Xylanaseproduktion**

Dargestellt ist der pH nach 96 h der 15 Experimente, die zur Optimierung eines Zulaufmediums für die Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344 durchgeführt wurden und der pH eines Satzprozesses als Referenz (Ref). Die Zulaufraten der drei Variablen sind den jeweiligen experimentellen Bedingungen zugeordnet. Alle Daten setzen sich aus jeweils 3 parallelen Ansätzen für die Optimierung und für die Referenz zusammen. Neben den Ergebnissen sind die Zulaufraten der 3 Variablen für die 15 Experimente dargestellt.

Der Mittelwert der relativen Standardabweichung für alle Experimente betrug 4,7 % und die maximale Standardabweichung zwischen drei parallelen Rührkesselreaktoren, wies eine relative Standardabweichung von 13,7 % auf.

Da der pH, wie bereits beschrieben, einen Einfluss auf die Xylanaseproduktion hat (vgl. Kapitel 6.1), sollte dieser bei den pH-ungeordneten Prozessen möglichst stabil gehalten werden. Dies war mit dem Puffer jedoch nicht möglich, weswegen der Zusammenhang zwischen den Zulaufmedien beziehungsweise deren Bestandteilen mit dem finalen pH der Prozesse untersucht wurde. Das Xylan zeigte keinen Einfluss auf den pH (Daten nicht dargestellt), deswegen wurde nur der Einfluss des zugegebenen Ammoniumnitrats und der Laktose auf den pH weiter korreliert (Abbildung 6.5).

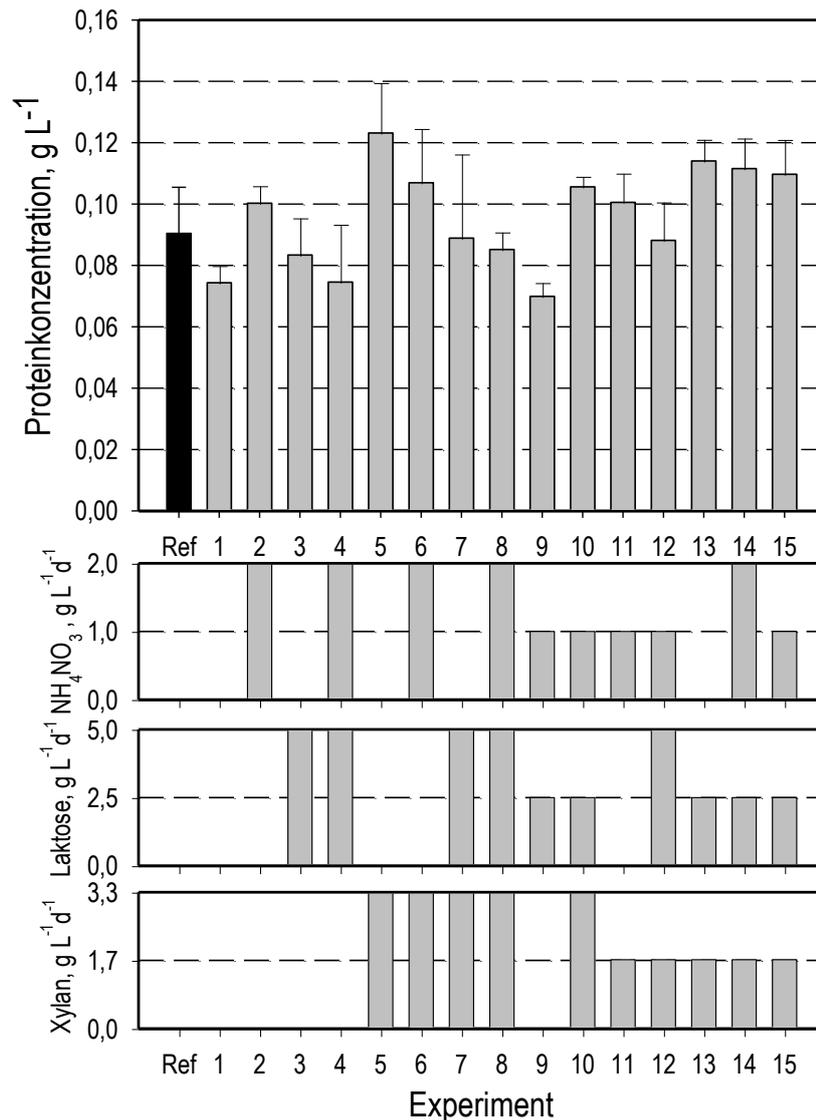


**Abbildung 6.5: Korrelation zwischen dem pH nach 96 h und der Zugabe von Ammoniumnitrat und Laktose über das Zulaufmedium**

Der pH im Medium nach 96 h wurde mit der zugegebenen Menge an (A) Ammoniumnitrat und (B) Laktose korreliert. Die Daten setzen sich jeweils aus Prozessen in drei parallelen Rührkesselreaktoren zusammen.

Für die Zugabe von Ammoniumnitrat zeigte sich in Abbildung 6.5-A ebenfalls kein erkennbarer Zusammenhang zum finalen pH. Die Verteilung des pH war für alle Ammoniumnitratzugaben unregelmäßig verteilt. Bei der Laktosezugabe ergab sich hingegen ein differenzierteres Bild. Wie die Abbildung 6.5-B darstellt, war der nach 96 h gemessene pH niedriger, je größer die Zugabe an Laktose war. Dabei wurde in allen fünf Experimenten mit der experimentellen Obergrenze der Laktosezugabe von  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose ein pH  $\sim 4,5$  gemessen. Für eine Zugabe von  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose lag das Mittel hingegen bei pH 5,8 und für die mittlere Zugabe bei pH 5,0.

Acht experimentelle Bedingungen zeigten höhere Proteinkonzentrationen, als in den Satzprozessen der Referenz für die  $0,09 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt wurden (Abbildung 6.6). Mit dem Betriebspunkt Nummer 5 wurde mit  $0,12 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Proteinmenge produziert und eine Steigerung von 33 % gegenüber der Referenz erreicht. Die vier Experimente 1, 3, 4 und 9 hatten kein Xylan im Zulaufmedium und zeigten die niedrigsten extrazellulären Proteinkonzentrationen von  $0,07 - 0,08 \text{ g L}^{-1}$ , die unter Einbezug der 20 % Volumenerhöhung im gleichen Konzentrationsbereich wie der Satzprozess waren.

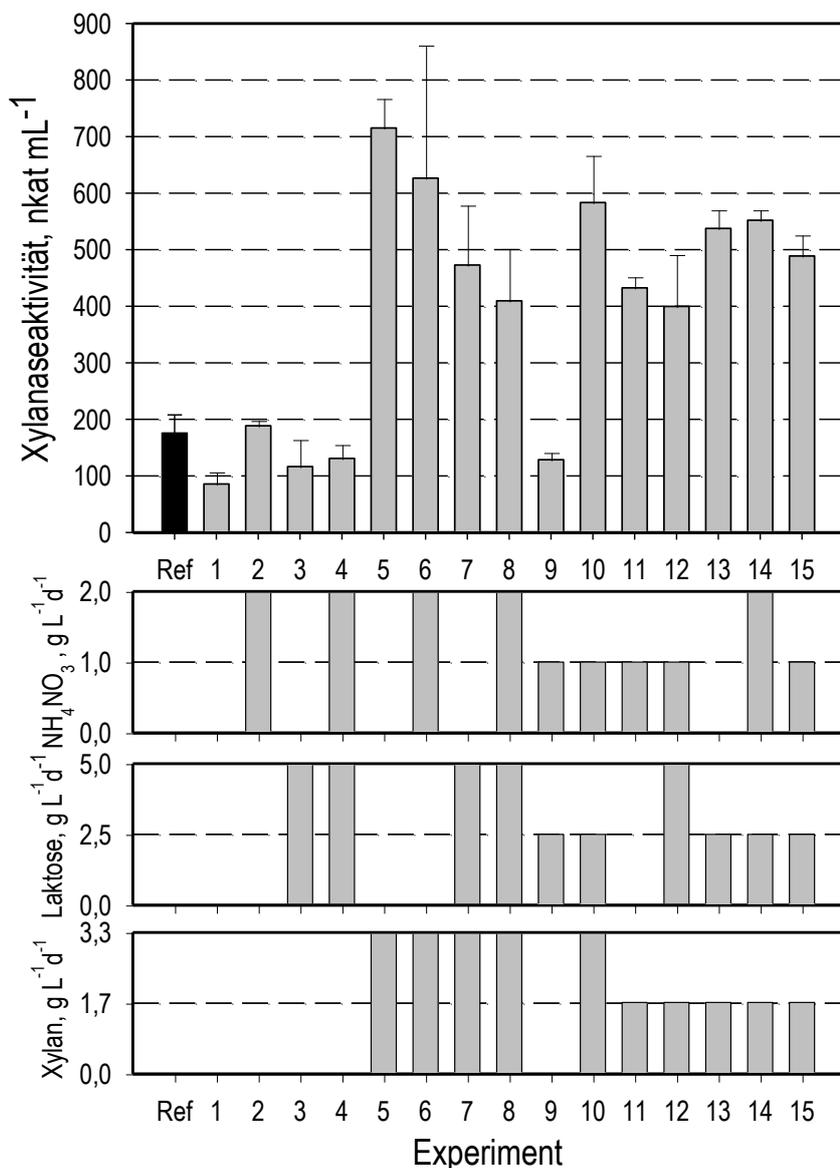


**Abbildung 6.6: Extrazelluläre Proteinkonzentration nach 96 h mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die extrazellulären Proteinkonzentrationen für die 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Xylanaseproduktion und der Referenz (Ref) mit *A. aculeatus* DSM 2344. Die Zulaufkonzentrationen der drei Variablen sind den jeweiligen experimentellen Bedingungen zugeordnet. Alle Daten setzen sich aus jeweils 3 parallelen Ansätzen für die Optimierung und für die Referenz zusammen. Neben den Ergebnissen sind die Zulaufkonzentrationen der 3 Variablen für die 15 Experimente dargestellt.

Die Xylanaseaktivitäten zeigten Standardabweichungen zwischen 3 % für Experiment 14 und 41 % für Experiment 3 (Abbildung 6.7). Der Mittelwert der relativen Standardabweichungen über alle 15 Experimente lag bei 17 % und war damit vergleichbar zum Referenzansatz. Für alle fünf Experimente ohne weitere Zugabe von Xylan (Experiment 1 – 4, 9 und die Referenz) wurden mit 86 – 189 nkat mL<sup>-1</sup> signifikant geringere Aktivitäten als für die Betriebsbedingungen mit Xylan im Zulaufmedium erzielt. Die höchste gemessene Aktivität wurde wiederum mit Experiment 5, bei dem nur Xylan zugeführt wurde, mit einer Aktivität von 715 ± 52 nkat mL<sup>-1</sup> erreicht. Diese Aktivität bedeutete eine Steigerung um den Faktor 4 gegenüber der Referenz im Satzverfahren. Ein Zulauf mit 5,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Laktose hatte bei der

höchsten Xylanzugabe einen negativen Einfluss, wie Experiment 7 und 8 im Vergleich zu Experiment 5, 6 und 10 zeigten. Bei einer mittleren Xylanzugabe von  $1,67 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  war eine gleichzeitige mittlere Laktosezugabe von  $2,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  jedoch besser, als keine oder höhere Laktosezugaben, wie die Experimente 13 – 15 im Vergleich zu Bedingungen 11 und 12 ergaben.

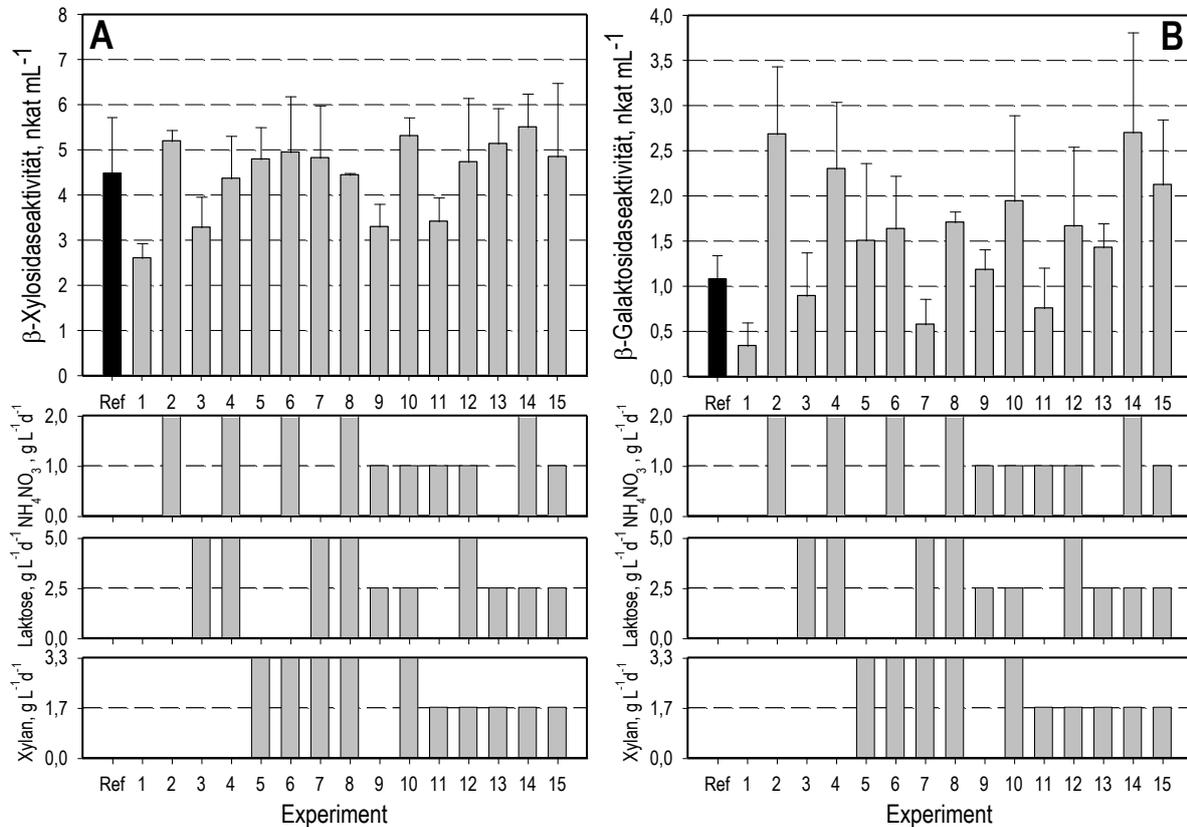


**Abbildung 6.7: Xylanaseaktivitäten nach 96 h mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die extrazellulären Xylanaseaktivitäten für die 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Xylanaseproduktion und der Referenz (Ref) mit *A. aculeatus* DSM 2344. Die Zulaufkonzentrationen der drei Variablen sind den jeweiligen experimentellen Bedingungen zugeordnet. Alle Daten setzen sich aus jeweils 3 parallelen Ansätzen für die Optimierung und für die Referenz zusammen. Neben den Ergebnissen sind die Zulaufkonzentrationen der 3 Variablen für die 15 Experimente dargestellt.

Die in den Experimenten produzierte  $\beta$ -Xylosidase (Abbildung 6.8-A) zeigte eine andere Verteilung der Aktivitäten zwischen den experimentellen Bedingungen als die der Xylanase. Die bestimmten  $\beta$ -Xylosidaseaktivitäten lagen zwischen  $2,61 \pm 0,33 \text{ nkat mL}^{-1}$  für Experiment 1 und  $5,51 \pm 0,74 \text{ nkat mL}^{-1}$  für Experiment 14. Im Gegensatz zur

Xylanaseaktivität waren die Abweichungen zwischen den minimalen und maximalen Aktivitäten mit einem Faktor von  $\sim 2$  relativ gering. Zudem ließen sich keine signifikanten Einflüsse durch die Variablen erkennen. Auch die Steigerung der Aktivität von Experiment 14 gegenüber der Referenz war mit 114 % geringer und zudem nicht signifikant.



**Abbildung 6.8:  $\beta$ -Xylosidase- und  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten nach 96 h mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die extrazellulären Aktivitäten der  $\beta$ -Xylosidase (A) und der  $\beta$ -Galactosidase (B) für die 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Xylanaseproduktion und der Referenz (Ref) mit *A. aculeatus* DSM 2344. Die Zulaufkonzentrationen der drei Variablen sind den jeweiligen experimentellen Bedingungen zugeordnet. Alle Daten setzen sich aus jeweils 3 parallelen Ansätzen für die Optimierung und für die Referenz zusammen. Neben den Ergebnissen sind die Zulaufkonzentrationen der 3 Variablen für die 15 Experimente dargestellt.

Höhere Unterschiede von bis zu  $\sim 800\%$  im Bereich von  $0,33 \pm 0,26$  nkat mL<sup>-1</sup> für Experiment 1 und  $2,70 \pm 1,11$  nkat mL<sup>-1</sup> für Experiment 14 wurden hingegen für die  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten zwischen den durchgeführten Experimenten gemessen (Abbildung 6.8-B). Gleichzeitig wurden sehr hohe Standardabweichungen bestimmt. Die drei höchsten  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten wurden mit einer maximalen Ammoniumnitratzugabe erreicht (Experiment 2, 4 und 14), wohingegen die experimentellen Bedingungen ohne Ammoniumnitratzugabe Aktivitäten  $< 1,5$  nkat mL<sup>-1</sup> zeigten. Die Betriebspunkte mit maximaler Laktosezugabe zeigten sowohl  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten im oberen Bereich der gemessenen Aktivitäten, wie für Experiment 4, 8 und 12, als auch  $< 1,0$  nkat mL<sup>-1</sup> wie für die Betriebspunkte 3 und 7. Die experimentellen Bedingungen, die hohe Aktivitäten aufwiesen, hatten als Unterschied zu denen mit niedrigen Aktivitäten Ammoniumnitrat im

Zulaufmedium. Durch die Zugabe von Ammoniumnitrat konnte also eine Verbesserung der Produktion der  $\beta$ -Galactosidase erreicht werden.

### **Diskussion**

In der Literatur sind für die Xylanaseproduktion mit *Aspergillus spp.* Prozess- und Optimierungsbedingungen von pH 5 bis pH 8 beschrieben (Cao et al., 2008; Chipeta et al., 2008; Li et al., 2007). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass zum Beispiel *A. niger* extrazelluläre Proteasen besitzt, die besonders im sauren Bereich aktiv sind und bei pH >5 nur geringe Aktivitäten aufzeigen (O'Donnell et al., 2001). Für *A. aculeatus* wurden hingegen die höchsten Proteaseaktivitäten bei pH 6,5 bis pH 7 beschrieben (Olutiola und Nwaogwugwu, 1982). Der für die Produktion von Xylanasen mit *Aspergillus spp.* am besten geeignete pH wird für pH~6 beschrieben (Techapun et al., 2003), wie er als Startbedingung in den durchgeführten Prozessen vorlag.

Da sich die Prozesse in eine Wachstumsphase (0 – 24 h) und eine Produktionsphase (24 – 96 h) kennzeichnen, können diese Phasen durch eine Temperaturänderung weiter unterstützt werden. Durch eine höhere Temperatur (>30 °C) wird dabei der Wachstumsprozess von *A. niger* beschleunigt (Yuan et al., 2005). Für *A. aculeatus* fanden Olutiola und Nwaogwugwu (1982) 30 °C als beste Wachstumstemperatur, weswegen diese für die ersten 24 h der Satzphase gewählt wurde. Niedrigere Temperaturen (<30 °C) begünstigen hingegen die Xylanaseproduktion, wie mit einer Temperaturerniedrigung auf 28 °C gezeigt werden konnte. Die Verwendung von löslichen Zuckern in der Xylanaseproduktion ist umstritten. Dabei wird zwar besonders Glukose und Laktose in vielen Produktionsprozessen verwendet, aber auch deren partielle Inhibition auf die Xylanaseproduktion wird in der Literatur beschrieben (Kadowaki et al., 1997; Knob et al., 2010, Smith und Wood, 1991). Neben diesen beiden Zuckern wies Maltose in einer Untersuchung von Simoes et al. (2009) den besten induzierenden Effekt auf die Xylanaseproduktion für *A. aculeatus* auf. Aus den hierzu gewonnenen Ergebnissen ließ sich durch Laktose die höchste Xylanaseaktivität nach 24 h finden. In dem weiteren Prozessverlauf zeigten jedoch die Prozesse mit Glukose im Medium die höchste Xylanaseproduktion. Der Einfluss des Zuckers ist auf die Länge der Prozesszeit jedoch nur sekundär, also nicht durch direkte Induktion oder Inhibition, sondern auf Unterschiede im Wachstum zurückzuführen.

Der positive Effekt, der von der Laktosezugabe auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten zu erwarten wäre (Fantès und Roberts, 1973), kann in den Experimenten nicht wiedergefunden werden. Bailey und Linko (1990) beobachteten für *A. oryzae* ebenfalls, dass die  $\beta$ -Galactosidase vor allem in Satzprozessen durch Laktose nur wenig induziert wurde und führen dies auf einen intrazellulären Überschuss von Glukose als Inhibitor zurück. Knob et al. (2010) beschreiben eine Nebenaktivität der  $\beta$ -Xylosidase gegenüber dem Substrat pNP-Galactopyranosid und damit einen Einfluss auf die gemessene  $\beta$ -Galactosidaseaktivität. Hierdurch könnten sich positive Einflüsse der drei Variablen auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität auf eine erhöhte

Aktivität der  $\beta$ -Xylosidase und entsprechende Nebenaktivitäten in den korrelierenden Experimenten beschränken. Aus diesem Grund und wegen der hohen gemessenen Standardabweichungen mit durchschnittlich 41 % über alle Experimente, war die Modellierung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten nicht weiter sinnvoll.

Mit der Zugabe des Ammoniumnitrats und dem fehlenden Einfluss auf den pH ließ sich ein Unterschied zu Ammoniumsulfat, wie es in den Experimenten in Kapitel 5 verwendet wurde, oder organischen Stickstoffquellen erkennen. Bei der Verwendung und dem Verbrauch von Ammoniumsulfat kam es durch die Freisetzung des Sulfat-Anions zu einem Abfall des pH, welcher durch die Zugabe von Korrekturmittel ausgeglichen werden musste. Der Aufschluss von Harnstoff, Casein oder Hefeextrakt lässt hingegen den pH im Medium ansteigen (Raimbault, 1980). Beide Effekte ließen sich hier nicht erkennen, da die Zugabe von Ammoniumnitrat keinen Einfluss auf den final gemessenen pH zeigte.

### 6.2.1 Schätzung der Enzymaktivitäten

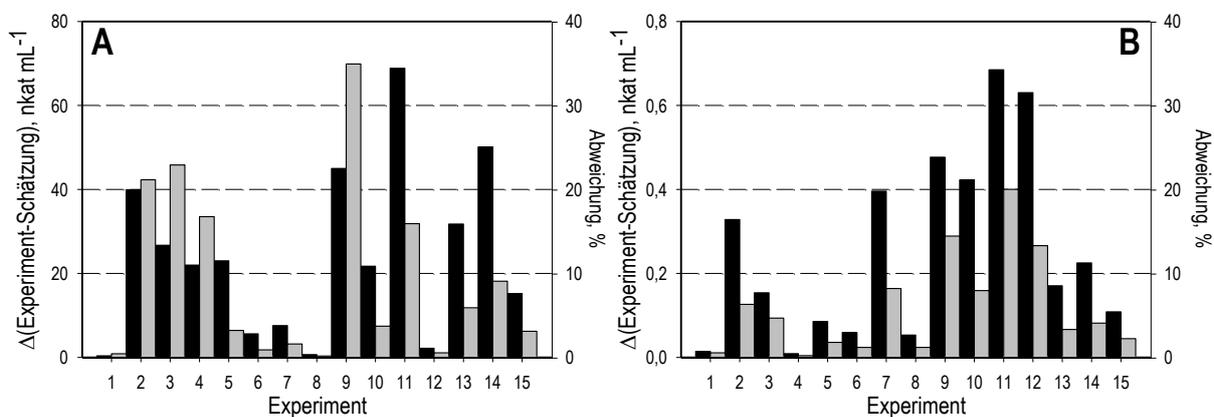
Auf Basis der gemessenen Enzymaktivitäten wurden die Parameter des empirischen Polynoms 2. Ordnung identifiziert. In Tabelle 6.1 sind hierfür die experimentellen Bedingungen und neben diesen die extrazellulären Aktivitäten der Xylanase und  $\beta$ -Xylosidase zusammengefasst.

Die untersuchten Bedingungen stellten die Eckpunkte innerhalb des untersuchten Versuchsraums dar. In Tabelle 6.2 sind die identifizierten Parameter aufgelistet. Aus den linearen Termen ( $\beta_i$ ) lässt sich ein genereller Einfluss des Parameters auf die Zielgröße erkennen. Die Interaktionsterme ( $\beta_{ij}$ ) zeigen, ob zwei Variablen sich gegenseitig beeinflussen und der quadratische Term ( $\beta_{ii}$ ) lässt erkennen, ob ein nicht linearer Einfluss auf die jeweilige Enzymaktivität vorliegt. Ammoniumnitrat wird dabei durch den Index „1“, Laktose durch Index „2“ und Xylan durch den Index „3“ beschrieben. Je niedriger die  $p$ -Werte der  $T$ -Statistik dabei sind, desto stärker ist der geschätzte Einfluss des jeweiligen Parameters auf das Modell. Nicht signifikante  $\beta$  wurden aus dem Modell solange entfernt, solange  $R^2$  sich verbesserte. Lineare Parameter blieben erhalten, wenn für diese zugehörige Interaktions- oder quadratische Terme existierten. Durch die anschließende erneute Parameteridentifikation und das Lösen der identifizierten Gleichung konnte eine Schätzung von Aktivitäten für den gesamten experimentellen Versuchsraum durchgeführt werden. Für die untersuchten Betriebspunkte wurden die zu erwartenden Aktivitäten geschätzt und mit den experimentellen Daten verglichen (Abbildung 6.9, Tabelle 6.1).

**Tabelle 6.1: Experimentelle Ergebnisse und Schätzungen einer Parameteridentifikation zur: Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit *A. aculeatus* DSM 2344 im Zulaufverfahren**

Dargestellt sind die in den 15 Experimenten eingesetzten Substratmengen sowie die experimentell ermittelten Aktivitäten. Xylan, Laktose und Ammoniumnitrat wurden ab einer Prozesszeit von 24 h mit einer Abtastzeit von 12 h zudosiert, wobei das dosierte Gesamtvolumen immer  $210 \text{ mL L}^{-1}$  betrug. Es wurden jeweils drei identische Parallelansätze durchgeführt. Die Enzymaktivitäten wurden nach einer Prozesszeit von 96 h bestimmt. Die geschätzten Aktivitäten wurden mit Gleichung 4.5 und den in Tabelle 6.2 dargestellten Parameter identifiziert.

Experiment Nummer	Xylan $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Laktose $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Xylanaseaktivität $\text{nkat mL}^{-1}$		$\beta$ -Xylosidaseaktivität $\text{nkat mL}^{-1}$	
				experimentell	geschätzt	experimentell	geschätzt
1	0,00	0,00	0,00	$86 \pm 21$	85	$2,61 \pm 0,33$	2,62
2	0,00	0,00	2,00	$189 \pm 9$	149	$5,20 \pm 0,24$	4,87
3	0,00	5,00	0,00	$117 \pm 48$	90	$3,29 \pm 0,68$	3,13
4	0,00	5,00	2,00	$131 \pm 24$	153	$4,37 \pm 0,94$	4,36
5	3,33	0,00	0,00	$715 \pm 52$	692	$4,80 \pm 0,71$	4,71
6	3,33	0,00	2,00	$627 \pm 235$	621	$4,95 \pm 1,24$	5,01
7	3,33	5,00	0,00	$473 \pm 106$	480	$4,83 \pm 1,16$	5,22
8	3,33	5,00	2,00	$410 \pm 92$	409	$4,45 \pm 0,04$	4,50
9	0,00	2,50	1,00	$129 \pm 13$	174	$3,30 \pm 0,51$	3,78
10	3,33	2,50	1,00	$584 \pm 83$	605	$5,32 \pm 0,41$	4,89
11	1,67	0,00	1,00	$432 \pm 20$	501	$3,42 \pm 0,53$	4,11
12	1,67	5,00	1,00	$400 \pm 92$	398	$4,74 \pm 1,42$	4,11
13	1,67	2,50	0,00	$538 \pm 33$	506	$5,14 \pm 0,78$	4,97
14	1,67	2,50	2,00	$552 \pm 18$	502	$5,51 \pm 0,74$	5,74
15	1,67	2,50	1,00	$489 \pm 37$	504	$4,85 \pm 1,63$	4,75


**Abbildung 6.9: Vergleich der experimentellen und geschätzten Aktivitäten**

Dargestellt ist die Differenz aus der experimentellen und geschätzten Aktivität (■) und deren prozentuale Abweichung (▒) für die 15 durchgeführten Experimente für die Xylanase- (A) und die  $\beta$ -Xylosidaseaktivität (B).

Die identifizierten Polynome 2. Ordnung sind graphisch in Abbildung 6.10 dargestellt. Dabei zeigte die Lösung zur volumetrischen Xylanaseaktivität (im folgenden Xylanasemodell), dass der als experimentelle Bedingung 5 untersuchte Betriebspunkt gleichfalls das Maximum des Versuchsraums darstellte. Weiterhin wird bei der Betrachtung des graphischen Xylanasemodells deutlich, dass mit einer niedrigeren Xylanzugabe auch die Xylanaseaktivität abnehmen sollte.

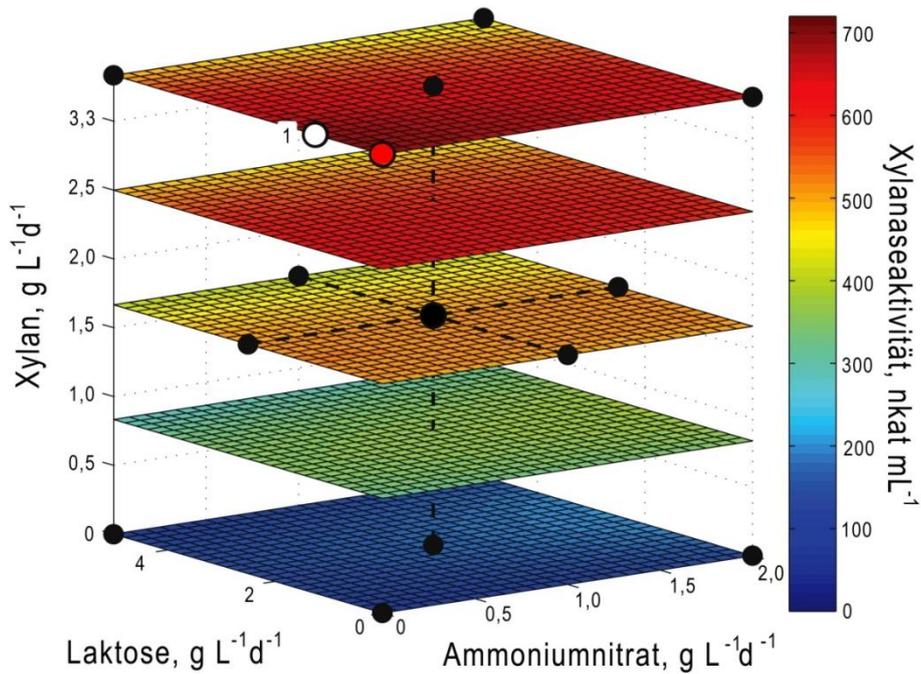
**Tabelle 6.2: Identifizierte Modellparameter: Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit *A. aculeatus* im Zulaufverfahren**

Dargestellt sind die identifizierten Modellparameter  $\beta$  (Gleichung 4.5) für beide Optimierungen. Parameter, bei denen das Zeichen „/“ eingetragen sind, wurden als nicht signifikant ausgeschlossen. Parameter wurden solange ausgeschlossen, wie dabei das  $R^2$  des Modells verbessert wurde und anschließend die Parameter neu identifiziert.

Parameter	Xyланasemodell	<i>p</i> -Werte	$\beta$ -Xylosidasemodell	<i>p</i> -Werte
$\beta_0$	503,9364	$1,040 \cdot 10^{-7}$	4,7452	$3,892 \cdot 10^{-7}$
$\beta_1$	-2,0223	0,890	0,3819	0,042
$\beta_2$	-51,8602	0,009	/	/
$\beta_3$	215,677	$1,380 \cdot 10^{-6}$	0,5575	0,009
$\beta_{12}$	/	/	-0,2547	0,183
$\beta_{13}$	/	/	-0,4873	0,0264
$\beta_{23}$	-33,6067	0,074	/	/
$\beta_{11}$	-54,0552	0,012	0,6081	0,086
$\beta_{22}$	-54,5115	0,084	-0,6374	0,074
$\beta_{33}$	-114,493	0,004	-0,4099	0,22

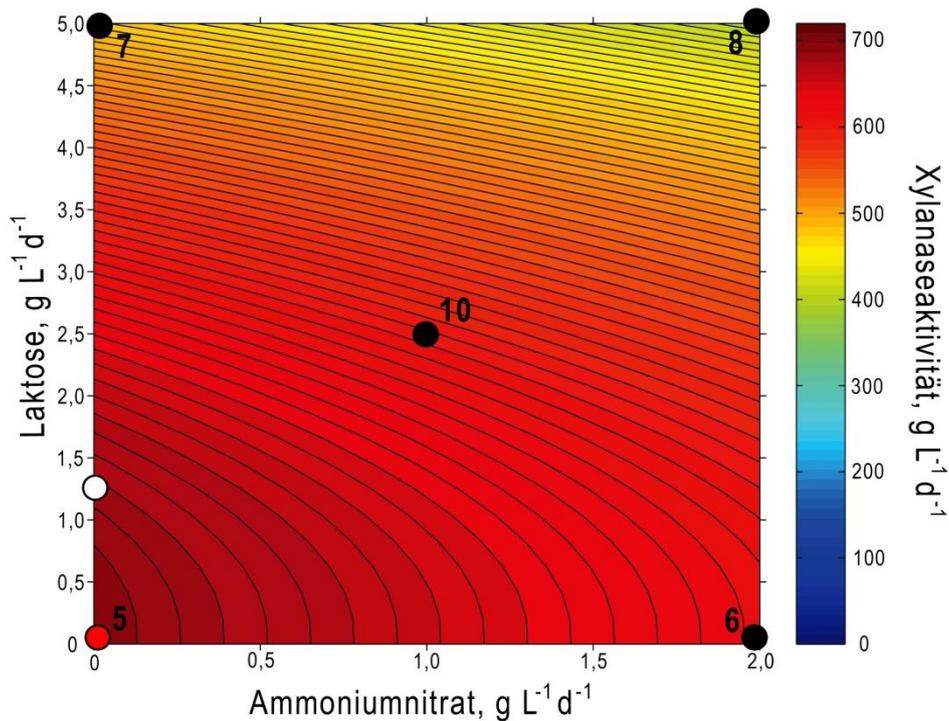
Die höchsten Aktivitäten ließen sich somit für Betriebspunkte mit maximaler Xylanzugabe von  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  messen. Deshalb wurden Betriebspunkte der maximalen Xylanzugabe in Abbildung 6.11 näher betrachtet, um die Einflüsse von Ammoniumnitrat und Laktose weiter aufzulösen. Bei zunehmender Zugabe von Ammoniumnitrat nahm die geschätzte Aktivität um maximal  $\sim 11 \%$  bei einer Zugabe von  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Experiment 6) ab. Experiment 7, das in dieser Ebene die maximale Zugabe von Laktose mit  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ohne die Zugabe von Ammoniumnitrat repräsentierte, wies hingegen eine geschätzte Aktivität auf, die nur  $70 \%$  des Maximums hatte. Die maximale Zugabe aller Variablen (Experiment 8) wird mit  $409 \text{ nkat mL}^{-1}$  auf  $59 \%$  des Maximums geschätzt.

Nach der Modellidentifikation wurde der in Abbildung 6.10 dargestellten Betriebspunkt experimentell validiert. Die Ergebnisse in Tabelle 6.3 zeigen, dass die geschätzte Aktivität eine Abweichung von weniger als  $10 \%$  von den gemessenen Aktivitäten aufwies. Auch eine Wiederholung von Experiment 5 (geschätztes Optimum) und 15 zeigte eine Übereinstimmung von  $> 90 \%$  mit der geschätzten Aktivität. Angesichts des mittleren Variationskoeffizienten von  $17 \%$  über alle Experimente (vgl. Kapitel 6.1) spricht diese Schätzung für die Güte des Modells.



**Abbildung 6.10: Graphische Darstellung des Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt ist die graphische Lösung der volumetrischen Xylanaseaktivität des quadratischen Polynoms mit den drei Variablen Ammoniumnitrat-, Laktose- und Xylanzugabe für Prozesse mit *A. aculeatus* DSM 2344. Der validierte Betriebspunkt (○; Zugabe von 0,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Ammoniumnitrat, 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Laktose und 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Xylan) und der bestimmte optimale Betriebspunkt (●) sind in der Graphik markiert. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Kultivierungen betrug immer 210 mL L<sup>-1</sup>.



**Abbildung 6.11: Volumetrische Xylanaseaktivität von *A. aculeatus* in Abhängigkeit von zwei Variablen**

Für die maximale Xylanzugabe von 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ist die Abhängigkeit der Xylanaseaktivität von der Laktose- und Ammoniumnitratdosierung für Prozesse mit *A. aculeatus* DSM 2344 dargestellt. Die auf der Ebene liegenden Experimente sind beschriftet und der validierte Betriebspunkt (○; Zugabe von 0,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Ammoniumnitrat, 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Laktose und 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Xylan) und der bestimmte optimale Betriebspunkt (●) sind in der Graphik markiert.

**Tabelle 6.3: Validierung des ‚Xylanasemodells‘**

Dargestellt ist die geschätzte und gemessene Aktivität für ein Validierungsexperiment, das in Abbildung 6.10 und Abbildung 6.11 eingezeichnet ist ( $0,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumnitrat,  $1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Xylan).

Geschätzte Aktivität nkat mL <sup>-1</sup>	Gemessene Aktivität nkat mL <sup>-1</sup>	Übereinstimmung
678	618 ± 126	91 %

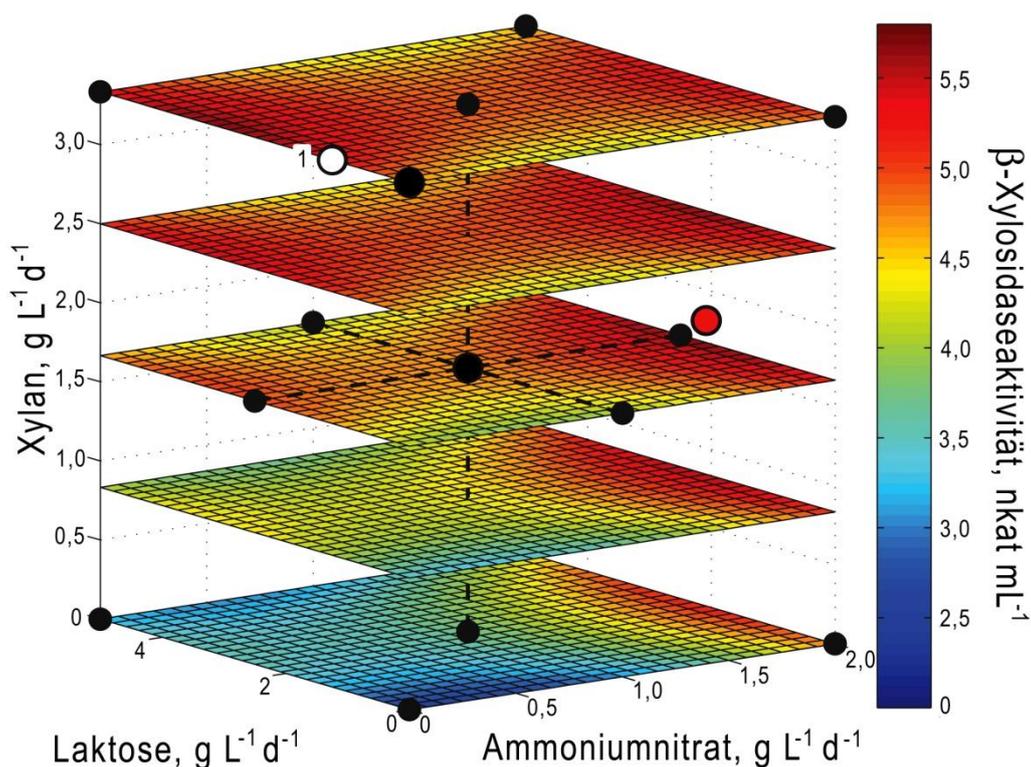
**Tabelle 6.4: Statistische Analyse der identifizierten Modelle zur Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit *A. aculeatus* DSM 2344 im Zulaufverfahren**

Dargestellt sind die Regressionskoeffizienten, die korrigierten Regressionskoeffizienten, die *F*-Werte und die *p*-Werte. Die *p*-Werte ergeben eine statistische Signifikanz für  $p < 0,05$ .

Koeffizient	‚Xylanasemodell‘	‚ $\beta$ -Xylosidasemodell‘
$R^2$	0,9764	0,8457
$R^2_{\text{korr}}$	0,9527	0,6913
<i>F</i> -Wert	41,32	5,48
<i>p</i> -Wert	$3,61 \cdot 10^{-5}$	0,020

Die Güte des Modells ließ sich zusätzlich an den statistischen Daten des Modells erkennen (Tabelle 6.4). Der Regressionskoeffizient des Xylanasemodells lag bei  $R^2 = 0,98$ . Durch den fast gleichen korrigierten Regressionskoeffizienten hat das Modell auch bei der hohen Anzahl der Parameter eine statistische Sicherheit von  $> 95 \%$ . Dagegen war die Lösung des Modells zur volumetrischen  $\beta$ -Xylosidaseaktivität (im folgenden  $\beta$ -Xylosidasemodell) mit  $R^2 = 0,85$  von einer geringeren statistischen Sicherheit.

Die graphische Darstellung des  $\beta$ -Xylosidasemodells in Abbildung 6.12 zeigte Unterschiede zum Xylanasemodell. Der Einfluss des Xylans ist nicht im gleichen Maße die entscheidende Variable wie beim Xylanasemodell. Zwar wurde generell mit zunehmender Xylanzugabe eine steigende Aktivität geschätzt, der Einfluss von Ammoniumnitrat und Laktose ist jedoch für alle Xylanzulaufzeiten erkenntlich. Das Optimum wurde für eine Zugabe von  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumnitrat,  $2,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $1,81 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Xylan mit einer geschätzten Aktivität von  $5,76 \text{ nkat mL}^{-1}$  bestimmt. Dieses Optimum war damit der experimentellen Bedingung 14 ähnlich, die bereits die höchste  $\beta$ -Xylosidaseaktivität der untersuchten Betriebspunkte aufwies (vgl. Kapitel 6.2) und für die eine Aktivität von  $5,74 \text{ nkat mL}^{-1}$  geschätzt wurde. Weiterhin ließ sich in allen dargestellten Ebenen die höchste Aktivität für eine mittlere Zugabemenge von Laktose erkennen. Eine hohe Zugabe von Ammoniumnitrat hatte einen positiven Effekt auf die  $\beta$ -Xylosidaseaktivität wobei bei hohen Xylanzulaufzeiten von  $> 2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  auch für eine geringe Zugabe von Ammoniumnitrat  $< 0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Aktivitäten über  $5,0 \text{ nkat mL}^{-1}$  geschätzt wurden.



**Abbildung 6.12: Graphische Darstellung des identifizierten Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt ist die volumetrische Xylanaseaktivität für die drei Variablen Ammoniumnitrat-, Laktose- und Xylandosierung für Prozesse mit *A. aculeatus* DSM2344 nach 96 h. Der validierte Betriebspunkt (O; Zugabe von 0,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Ammoniumnitrat, 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Laktose und 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Xylan) und der bestimmte optimale Betriebspunkt (●) sind in der Graphik markiert. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Kultivierungen betrug immer 210 mL L<sup>-1</sup>.

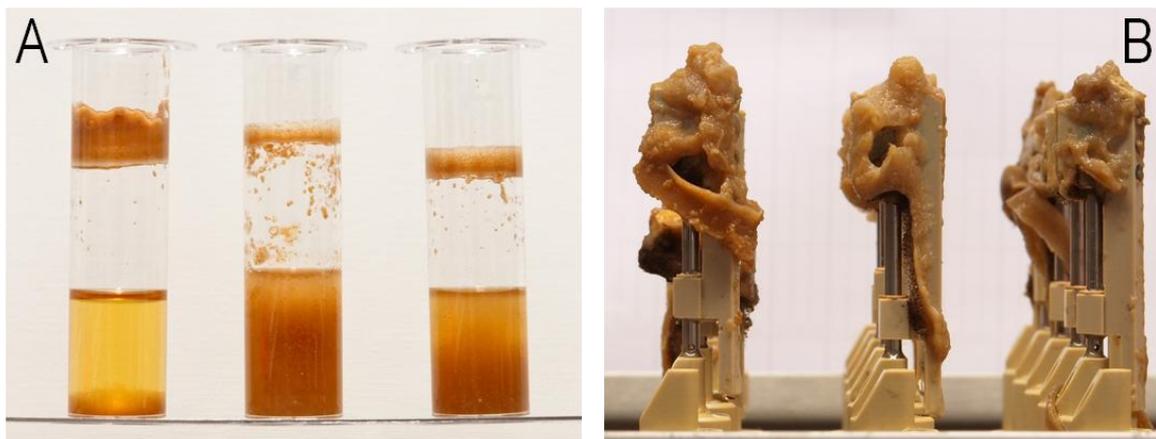
Für das  $\beta$ -Xylosidasemodell wurde nun ebenfalls ein Betriebspunkt als Validierung erneut untersucht (Abbildung 6.12). Das Ergebnis ist in Tabelle 6.5 dargestellt. Für die Validierung wurde nicht das Optimum gewählt, da dieses zu dicht an Experiment 14 lag und die Standardabweichung zu groß für eine exakte Auflösung war. Stattdessen sollten die hohen Aktivitäten geprüft werden, die um den Validierungspunkt graphisch dargestellt waren. Ebenso wie für das Xylanasemodell konnte eine Übereinstimmung von mehr als 90 % zwischen der geschätzten und der gemessenen Aktivität gefunden werden. Dies zeigte, dass trotz der schlechteren statistischen Werte im Vergleich zum Xylanasemodell (Tabelle 6.4), dieses Modell zu den Aktivitäten der  $\beta$ -Xylosidase im Bereich der Validierung ebenfalls eine Vorhersage mit über 90 % Sicherheit machen konnte.

**Tabelle 6.5: Validierung des ‚Xylosidasemodells‘**

Dargestellt ist die geschätzte und gemessene Aktivität zur Validierung des Xylosidasemodells (Zugabe von 0,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Ammoniumnitrat, 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Laktose und 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Xylan).

Geschätzte Aktivität nkat mL <sup>-1</sup>	Gemessene Aktivität nkat mL <sup>-1</sup>	Übereinstimmung
5,40	5,27 ± 1,07	98%

Eine Optimierung von Prozessbedingungen im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab für *A. aculeatus* DSM 2344 war durchführbar, wie die Erstellung der Modelle bewies. Jedoch waren selbst in parallelen Ansätzen mit identischen Bedingungen starke optische Unterschiede im Biomassewachstum erkennbar (Abbildung 6.13-A). Die Biomasse am Rührer und an der Reaktorwand machte 25 – 93 % der gesamten Biomasse in den jeweiligen Rührkesselreaktoren aus (Abbildung 6.13-B), sodass teilweise nur geringe Mengen Biomasse frei in der Kulturflüssigkeit vorlagen. Die Verwendbarkeit der Milliliterreaktoren für eine Optimierung mit *A. aculeatus* wäre aufgrund des Wachstums also als schwierig eingeschätzt worden.



**Abbildung 6.13: Reaktoren und Rührer nach einer Kultivierung mit *A. aculeatus* DSM 2344 zur Optimierung der Xylanaseproduktion im Millilitermaßstab**

Die Photographien zeigen drei parallele Rührkesselreaktoren die unter identischen Reaktionsbedingungen (A) betrieben wurden. Zudem sind die Rührorgane von drei verschiedenen Bedingungen und dem Unterschied im Wachstum (B) nach 96 h Prozesszeit zu erkennen.

### Diskussion

Der positive Einfluss des Xylans auf die Xylanaseproduktion lässt sich eindeutig feststellen – ebenso, wie eine negative Wirkung von Laktose. Dabei ist der positive Effekt des Xylans auf die Xylanaseproduktion mit *Aspergillus spp.* akzeptiert und gut beschrieben (Beg et al., 2001; Polizeli et al., 2005). Höhere Zulaufraten hätten die Xylanaseproduktion wahrscheinlich weiter erhöhen können, waren jedoch unter den verwendeten experimentellen Bedingungen mit dem Laborroboter nicht realisierbar. Die Zufuhr von Xylan während des Produktionsprozesses zeigte für die verwendeten Zulaufraten eine deutliche Steigerung in der Xylanaseaktivität im Vergleich zum Satzprozess. Ähnliche Effekte konnten für einen *Bacillus* Stamm im Zulaufverfahrens beobachtet werden (Schneider et al., 2001). Dagegen war die Produktion von Xylanasen mit *Bacillus* auf Reisstroh im Satzverfahren besser oder gleich, im Verhältnis zu Zulaufprozessen (Kim et al., 1997).

Auch wenn für die Nutzung von Laktose als Kohlenstoffquelle höhere Xylanaseaktivitäten beschrieben sind als für die Nutzung von Glukose (Kadowaki et al., 1997; Smith und Wood, 1991), zeigte die Laktose in diesen Untersuchungen eine inhibierende Wirkung. Der negative

Einfluss der Laktose auf die Xylanaseproduktion kann unter anderem auf die intermittierende Zugabe des Zulaufmediums mit einer Abtastzeit von 12 h zurückgeführt werden. Hierdurch kam es in den Kulturen für einige Stunden immer wieder zu einem kurzzeitigen Substratüberschuss, der zu einer damit gekoppelten Inhibierung der Xylanaseproduktion geführt haben kann. Zudem führte die Zugabe der Laktose zu einer Reduzierung des pH in einen für die Produktion von Xylanasen ungünstigeren Bereich (siehe Kapitel 6.2). Einige *Aspergillus spp.* unter anderem auch *A. aculeatus*, können unter Bedingungen eines Zuckerüberschusses Zitronensäure und Oxalsäure produzieren. Dabei wird Laktose als eines der bevorzugten Substrate hierfür beschrieben (Grewal und Kalra, 1995). Die Reduzierung des pHs in den durchgeführten Experimenten ist wahrscheinlich durch die Freisetzung dieser Nebenprodukte zu erklären. Dies wird besonders deutlich, da die Zugabe von Ammoniumnitrat in Konzentrationen über 0,25 % die Oxalsäureproduktion weiter fördert (Grewal und Kalra, 1995).

Der Einfluss des Ammoniumnitrats auf die Xylanaseaktivität war in diesen Untersuchungen ansonsten nur gering. Im Gegensatz zu dem hier erstellten Modell wurde Ammoniumnitrat bei Prozessen von *A. oryzae* auf Eukalyptuszellstoff als die beste Stickstoffquelle bestimmt (Szendefy et al., 2006). Bei diesen Untersuchungen waren die Aktivitätssteigerungen und die optimale Stickstoffquelle jedoch im Wesentlichen von der Kohlenstoffquelle abhängig und wurde zusätzlich mit der Beeinflussung des pHs durch andere Stickstoffquellen wie Kaliumnitrat oder Ammoniumsulfat begründet. Für Bagassezellstoff als Substrat fanden die Autoren dagegen Maisquellwasser als beste Stickstoffquelle und stimmten damit mit anderen Autoren überein, die neben diesem die beste Xylanaseproduktion mit Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt und Ammoniumsulfat für *Aspergillus spp.* erreichten (Min et al., 2007; Li et al., 2007).

Im Gegensatz zu der Xylanaseproduktion zeigten alle drei hier verwendeten Variablen einen Einfluss auf die Produktion von  $\beta$ -Xylosidase, wie das entsprechende Modell zeigte. Knob et al. (2010) fassen zusammen, dass Glukose generell inhibierende Effekte auf die  $\beta$ -Xylosidaseproduktion zeigt, diese Inhibition jedoch auch von Xylose dem Abbauprodukt des Xylans ausgehen kann. Dies kann der Grund für die beste Produktion bei mittleren Xylanzulaufzeiten sein, bei denen die Organismen die Xylose im Medium vollständig aufbrauchen konnten. Der positive Einfluss des Laktosezulaufs kann in der Verschiebung des pH in Bereiche zwischen pH 4,5 und pH 5,0 liegen, da das Optimum der  $\beta$ -Xylosidaseproduktion für die meisten *Aspergillus spp.* zwischen pH 4 und pH 5 beschrieben ist (Knob et al., 2010). Für pH > 4,5 wird zudem ein positiver Effekt von Ammoniumnitrat auf die Produktion der  $\beta$ -Xylosidasen mit *A. awamori* beschrieben (Lemos et al., 2001).

Das starke Wachstum an der Reaktorwand und den Rührorganen ist bei *Aspergillus spp.* nicht ungewöhnlich. Larsen et al. (2004) zeigten für *A. oryzae*, dass im Rührkesselreaktor im Litermaßstab über 30 % der Biomasse an den Einbauten und Wänden immobilisiert waren. Diese große Menge an immobilisierter Biomasse kann auch die großen Standardabweichungen zwischen den parallelen Ansätzen von ~ 20 % zur Folge haben. Um

aufgrund dieser hohen Standardabweichungen Unterschiede von 20 % aufzuzeigen, wären nach Vester et al. (2009a) 18 Produktionsprozesse mit identischen Bedingungen nötig. Für das Erkennen von Unterschieden im Bereich von 15 % wären es sogar 30. Da diese Anzahl an parallelen Bioreaktoren in der Regel nicht zu betreiben sind, muss weiter an der Verbesserung der parallelen Reproduzierbarkeit gearbeitet werden.

Durch die Zulaufprozesse im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab wurde erstmals der Einfluss von Xylan, Laktose und Ammoniumnitrat auf die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit *A. aculeatus* beschrieben. Dabei wurden zum ersten Mal Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab für die Kultivierung von *Aspergillus spp.* eingesetzt. Die parallelen Prozesse ermöglichten die Charakterisierung der betrachteten Variablen des Zulaufmediums innerhalb kurzer Zeit.

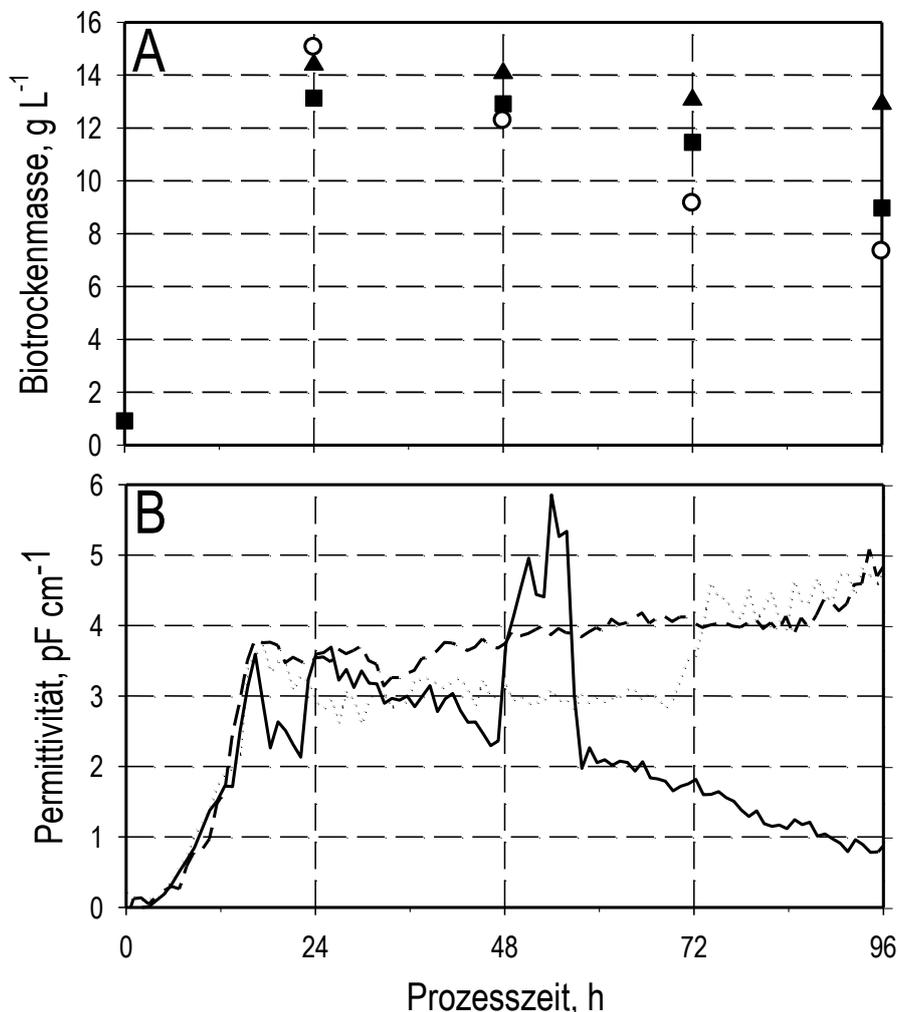
### 6.3 Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Das Zulaufexperiment 1 ohne die Zugabe von Substrat und Stickstoff, Experiment 5 als Betriebspunkt mit der höchsten Xylanaseaktivität, und Betriebspunkt 15 als Mittelpunkt des untersuchten experimentellen Raums wurden weiter im Rührkesselreaktor im Litermaßstab charakterisiert und die Erkenntnisse mit den Ergebnissen aus dem Millilitermaßstab verglichen. Im Litermaßstab wurde im Gegensatz zu den Prozessen im Millilitermaßstab die Satzphase im gleichen Reaktor wie die Zulaufphase durchgeführt und die Prozessbedingungen dabei gegenüber dem Millilitermaßstab geändert (Tabelle 6.6). Der volumetrische Leistungseintrag betrug im Litermaßstab  $1,33 - 7,75 \text{ W L}^{-1}$  und war damit während eines Großteil des Prozesses höher, als die  $1,57 \text{ W L}^{-1}$  im Millilitermaßstab. Die maximale Energiedissipation und der  $k_{La}$  waren mit  $149,8 \text{ W kg}^{-1}$  und  $\sim 0,25 \text{ s}^{-1}$  um den Faktor 10 höher, als im Millilitermaßstab mit  $9,4 \text{ W kg}^{-1}$  und  $\sim 0,027 \text{ s}^{-1}$ .

**Tabelle 6.6: Prozessparameter für Produktionsprozesse mit *A. aculeatus* DSM 2344 im Rührkesselreaktor**

Parameter	Millilitermaßstab	Litermaßstab
Rührerdrehzahl	$1000 \text{ min}^{-1}$	$500 - 900 \text{ min}^{-1}$ ab 24h: $900 \text{ min}^{-1}$
Volumetrischer Leistungseintrag	$1,57 \text{ W L}^{-1}$	$1,33 - 7,75 \text{ W L}^{-1}$
Maximale Energiedissipation	$9,4 \text{ W kg}^{-1}$	$25,7 - 149,8 \text{ W kg}^{-1}$
$k_{La}$	$0,027 \text{ s}^{-1}$	$\sim 0,25 \text{ s}^{-1}$
Begasungsrate	$1 \text{ L min}^{-1}$	$0,25 - 1,5 \text{ vvm}$
	(in alle Reaktoren)	
pO <sub>2</sub> -Bereich	$> 20\%$	$> 20\%$
Sicherstellung der O <sub>2</sub> -Versorgung	ausreichend	Rührerdrehzahl und Begasungsrate
Zugabe von Zulaufmedium	Intermittierend (Abtastzeit 12 h)	Intermittierend (Abtastzeit 12 h)
Satzphase	In Schüttelkolben	Im gleichen Reaktor

Als zusätzliche Information im Litermaßstab wurde die Biotrockenmasse gemessen und mit der Lebendbiomassekonzentration verglichen, die mit Hilfe einer Biomassesonde als Kapazität (iSensor, Fogale nanotech) über die gesamte Prozesszeit bestimmt wurde (Abbildung 6.14).



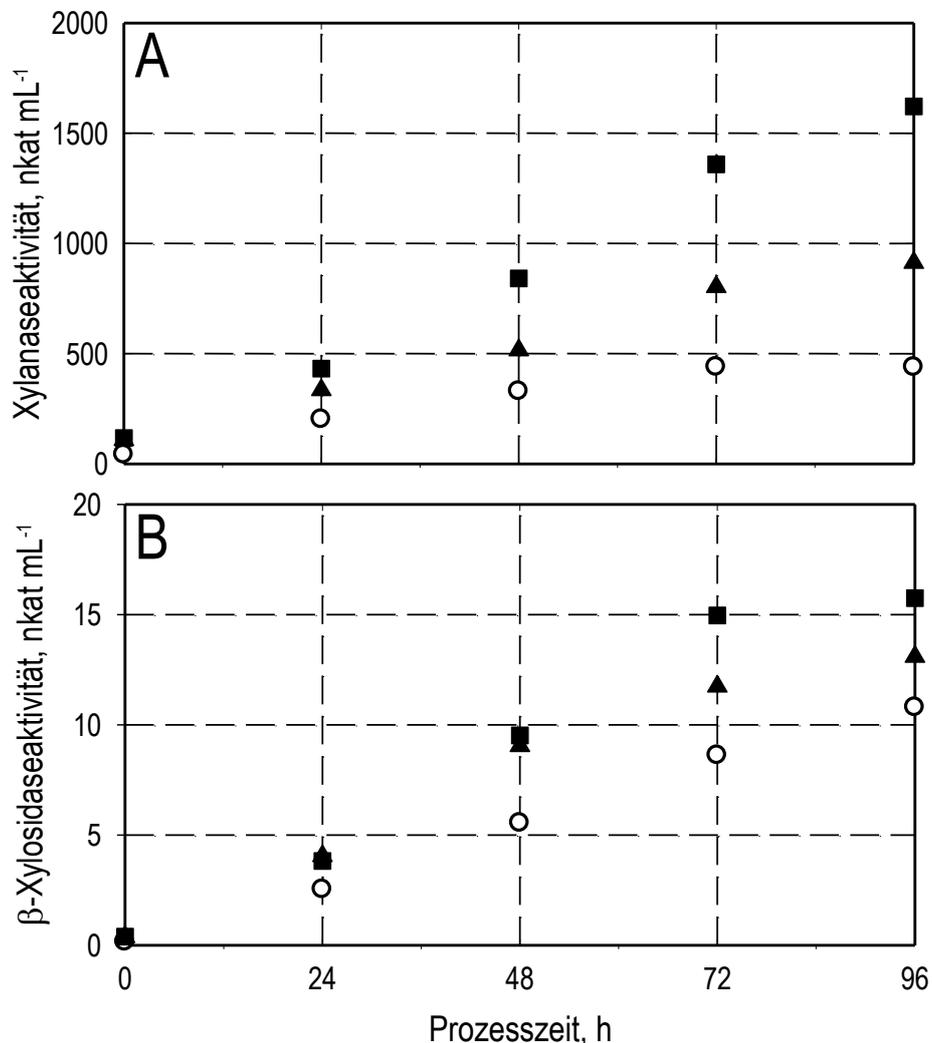
**Abbildung 6.14: Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die Biotrockenmassekonzentration (A) und die als Permittivität mittels einer Biomassesonde (iSensor, Fogale nanotech) online gemessene Lebendbiomassekonzentration (B) für Prozesse mit *A. aculeatus* DSM 2344 zur Produktion von Xylanasen. Dabei wurden die Bedingungen von Experiment 1 (○ & —), 5 (■ & ---) und 15 (▲ & ···) aus der Optimierung jeweils einfach kultiviert. Die online bestimmte Lebendbiomassekonzentration wurde als Permittivität gemessen und die Daten mit einer Funktion geglättet (vgl Kapitel 4.3.1.3).

Für alle drei Prozesse waren die Prozessbedingungen während der ersten 24 h identisch, außer dass für Experiment 5 und 15 Buchenxylan statt Birkenxylan verwendet wurde. Die gemessene Biotrockenmassekonzentration zeigte nach 24 h Kultivierung für alle drei Prozesse die höchsten Werte zwischen  $13 \text{ g L}^{-1}$  und  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Anschließend sank sie, so dass nach 96 h für Experiment 1  $7,3 \text{ g L}^{-1}$  und für Experiment 5 eine Konzentration von  $9,3 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurden. Das Experiment 15, das Laktose im Zulaufmedium hatte, zeigte nach 96 h die höchste Biotrockenmassekonzentration mit  $12,9 \text{ g L}^{-1}$ . Für die mit einer Biomassesonde bestimmte Lebendbiomassekonzentration zeigte sich zu Beginn des Prozesses bis 16 h ein

vergleichbares Wachstum mit einer Wachstumsrate von  $\mu \approx 0,3 \text{ h}^{-1}$  für alle drei Prozesse. Die Lebendbiomassekonzentration von Experiment 1 blieb bis 28 h bei  $\sim 3,7 \text{ pF cm}^{-1}$  und nahm anschließend bis 96 h nahezu konstant auf  $\sim 0,7 \text{ pF cm}^{-1}$  ab. Der erneute sprunghafte Anstieg des Signals bei einer Prozesszeit von 48 h könnte dabei auf Wachstum an der Sonde oder eine Veränderung in der Begasung zurückzuführen sein. Die Prozesse mit den Zulaufmedien von Experiment 5 und 15 zeigten hingegen von 24 h bis 72 h jeweils relativ gleichbleibende Lebendzellkonzentrationen um  $4 \text{ pF cm}^{-1}$  beziehungsweise  $3 \text{ pF cm}^{-1}$ . Ab 72 h traten Anstiege in den Messsignalen der Biomassesonde ein. Nach 96 h wiesen beide Prozesse eine vergleichbare Lebendbiomassekonzentration von  $\sim 4,8 \text{ pF cm}^{-1}$  auf.

Neben den Biomassekonzentrationen wurden für die Kultivierungen im Litermaßstab die Aktivitäten der Xylanasen und  $\beta$ -Xylosidasen über den gesamten Prozesszeitraum gemessen (Abbildung 6.15).



**Abbildung 6.15: Verlauf der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Zulaufkultivierungen von *A. aculeatus* DSM 2344 zur Produktion von Xylanasen**

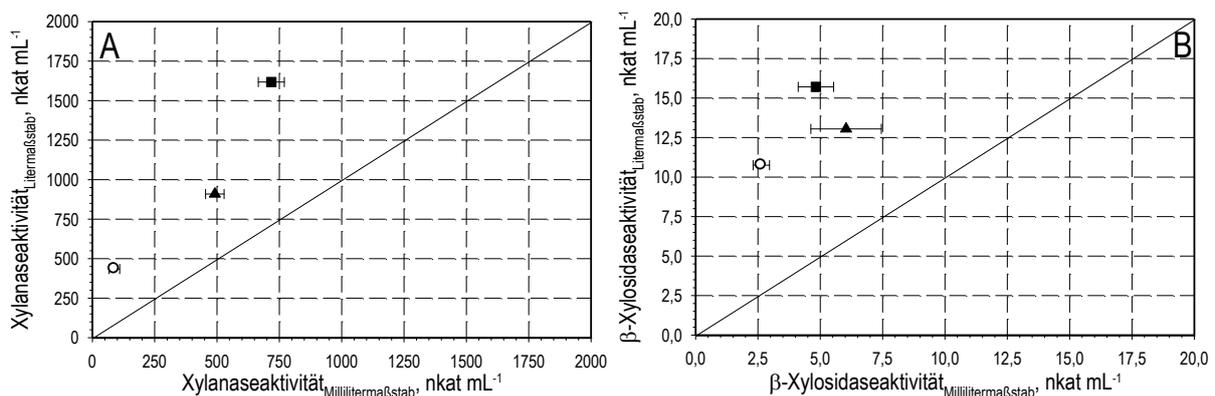
Der zeitliche Verlauf von Xylanase- (A) und  $\beta$ -Xylosidaseaktivitäten (B) für Prozesse mit *A. aculeatus* DSM 2344 im Litermaßstab, wobei Experiment 1 (○), 5 (■) und 15 (▲) jeweils einfach kultiviert wurden.

Dabei wurde für beide Enzyme und alle experimentellen Bedingungen eine lineare Aktivitätszunahme bis zu einem Zeitpunkt von 72 h bestimmt. Die Xylanaseaktivitäten der

drei Prozesse zeigten bereits nach 24 h Prozessdauer Unterschiede. Wie bei den Biomassesignalen, bei denen der Prozess mit der experimentellen Bedingung 5 die höchste Biomassekonzentration nach 24 h aufwies, war auch die Xylanaseaktivität für diese Prozessbedingung bereits nach 24 h höher, als bei den anderen Prozessen. Weiterhin nahm die Xylanaseaktivität hier linear zu, bis nach 96 h eine Aktivität von  $1621 \text{ nkat mL}^{-1}$  gemessen wurde. Für Experiment 15 zeigte sich eine Zunahme bis auf  $912 \text{ nkat mL}^{-1}$ . Bei Experiment 1 war hingegen die höchste Aktivität von  $439 \text{ nkat mL}^{-1}$  bereits nach 72 h erreicht und blieb anschließend konstant.

Vergleichbar sah es für die  $\beta$ -Xylosidaseaktivitäten aus, jedoch war hier auch für die Bedingung 1 eine über die 72 h hinaus ansteigende Aktivität bis auf  $10,8 \text{ nkat mL}^{-1}$  zu messen. Für Experiment 5 und 15 wurden in den ersten 48 h die gleichen Aktivitäten für die  $\beta$ -Xylosidase gemessen. Bei 96 h war die Aktivität von Experiment 5 mit  $15,7 \text{ nkat mL}^{-1}$  jedoch bei 120 % der Aktivität von Experiment 15.

Die nach 96 h Prozesszeit bestimmten Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseaktivitäten in den beiden Maßstäben wurden in Abbildung 6.16 miteinander verglichen.



**Abbildung 6.16: Vergleich der Skalierbarkeit von Experimenten zur Optimierung der**

**Xylanaseproduktion mit *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt sind die Xylanase- (A) und  $\beta$ -Xylosidaseaktivitäten (B) nach 96 h Prozesszeit von *A. aculeatus* DSM 2344. Die Ergebnisse zeigen die Aktivitäten von Kultivierungen mit drei verschiedenen Zulaufmedien im Milliliter- und Litermaßstab. Dabei wurden Experiment 1 (○), 5 (■) und 15 (▲) im Litermaßstab jeweils einfach und im Millilitermaßstab im Dreifachansatz durchgeführt.

Die Aktivitäten im Rührkesselreaktor im Litermaßstab waren um den Faktor 2 bis 5 höher als im Millilitermaßstab, weshalb keine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Maßstäben möglich war. Dabei ließen sich für die Xylanaseaktivität die gleichen Tendenzen in den beiden Maßstäben erkennen: Mit der experimentellen Bedingung 1 wurden die niedrigsten und mit 5 die höchsten Aktivitäten erreicht. Ein linearer Zusammenhang zwischen den Maßstäben bestand hingegen nicht. Für die Aktivitäten der  $\beta$ -Xylosidase ließen sich hingegen auch keine vergleichbaren Tendenzen erkennen. Die einzige Gemeinsamkeit war, dass mit Experiment 1 jeweils die niedrigsten Aktivitäten erreicht wurden.

### **Diskussion**

Eine Maßstabsübertragung der Prozesse aus den Rührkesselreaktoren des Millilitermaßstabs wurde nicht durchgeführt. Zwar wurden in beiden Maßstäben die gleichen Satzmedien, Zulaufmedien und Zulaufraten verwendet, die Rührkesselreaktoren unterschieden sich jedoch grundlegend in der Art der Begasung. Im Millilitermaßstab erfolgte die Begasung über die Oberfläche und im Litermaßstab über eine aktive Begasung. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Leistungseinträge gewählt, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag in die Flüssigphasen zu ermöglichen. In den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab fand das Wachstum von *A. aculeatus* aufgrund des hohen Oberfläche-Volumen-Verhältnisses zu 25 - 90 % immobilisiert an den Oberflächen der Reaktorwand und des Rührorgans statt. Mit dem gewählten Leistungseintrag konnte der gewünschte Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase erreicht werden. Im Rührkesselreaktor im Litermaßstab musste hingegen ein höherer Leistungseintrag gewählt werden, um den  $pO_2$  über 20 % Luftsättigung zu halten. Die unterschiedlichen Leistungseinträge zur Sicherstellung der Luftsättigung in der Flüssigphase lassen sich wahrscheinlich auch auf die höhere Biomassekonzentration in der Flüssigphase der Experimente im Litermaßstab im Verhältnis zum Millilitermaßstab zurückführen.

In den ersten 24 h der Prozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab zeigte sich eine starke Zunahme der Biotrockenmasse. Diese Zunahme ließ sich auch in den online bestimmten Werten erkennen. Hier fand ein schnelles Wachstum auf der im Satzmedium vorhandenen Laktose statt. Das im Satzmedium vorgelegte Xylan schien ein weiteres Wachstum nicht zu ermöglichen, wie Experiment 1 zeigte. Durch die Zufuhr von Xylan bzw. Xylan und Laktose konnte hingegen die Abnahme an Biomasse reduziert und die Lebendbiomasse erhalten bleiben, wie die anderen beiden Experimente bestätigten.

Der Einfluss des Zulaufmediums auf die produzierten Xylanasen lässt sich aus den Daten erkennen. Unter den Bedingungen von Experiment 1 schien das im Satzmedium vorhandene Xylan nach ~ 72 h aufgebraucht zu sein, so dass es zu keiner weiteren Induktion der Xylanaseproduktion kam (Beg et al., 2001; Knob et al., 2010). Für die anderen beiden Prozesse zeigte sich aufgrund der Xylanzufuhr eine lineare Produktion über die gesamten 96 h Prozesszeit. Auch bei den Aktivitäten der  $\beta$ -Xylosidase zeigten sich im Litermaßstab ab 24 h Unterschiede zwischen den Prozessen, die jedoch nicht so ausgeprägt waren.

Ein weiterer Unterschied von Experiment 5 und 15 gegenüber der experimentellen Bedingung 1 und den Prozessen im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab war die Verwendung von Buchenxylan statt Birkenxylan als Substrat. Da die Bestimmung der Xylanaseaktivität trotz der Änderung des Substrats weiterhin mit Birkenxylan durchgeführt wurde, kann es hierdurch zu einer Änderung der gemessenen Aktivitäten für Experiment 5 und 15 gekommen sein. Der Einfluss verschiedener Xylane unter sonst unveränderten Prozessbedingungen konnte auch an anderer Stelle beobachtet werden (Cavalo Peixoto-Nogueira et al., 2009). Romanowska et al. (2006) zeigten für eine Xylanase von *A. niger*, dass diese gegenüber Buchenxylan nur 34 % der Aktivität, wie gegenüber Birkenxylan aufwies, obwohl die Produktion auf keinem der beiden Xylane stattfand.

Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Maßstäben war auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen nicht zu erwarten. Durch die Prozesse in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab konnten die Einflüsse der drei betrachteten Variablen zwar näher untersucht werden, aber nur für die Xylanase ließ sich so eine Prozessbedingung mit deutlich erhöhter Produktivität finden, die auch im Litermaßstab reproduziert werden konnte. Da die Produktionsprozesse im Litermaßstab nur einfach durchgeführt wurden, ist besonders bei den hohen Standardabweichungen in der  $\beta$ -Xylosidaseaktivität der Unterschied zwischen den Experimenten nicht signifikant.

#### 6.4 Zusammenfassung

Die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 wurde in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab untersucht. Es zeigten sich Standardabweichungen in der Xylanaseproduktion, die mit Prozessen im Schüttelkolben vergleichbar waren, obwohl das Wandwachstum in den Rührkesselreaktoren höher war.

Mit Hilfe eines empirischen Modells (Polynom 2. Ordnung) wurden die Einflüsse von Xylan, Laktose und Ammoniumnitrat im Zulaufmedium auf die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit *A. aculeatus* nach 96 h untersucht und mit Bedingungen eines Satzverfahrens verglichen. Durch eine intermittierende Zufuhr von Xylan konnte eine Steigerung der Xylanaseproduktion um den Faktor 4 auf  $715 \pm 52$  nkat mL<sup>-1</sup> erreicht und validiert werden. Für die  $\beta$ -Xylosidase wurde eine maximale Aktivität von 5,76 nkat mL<sup>-1</sup> nach 96 h Prozesszeit mit Hilfe des identifizierten Polynoms 2. Ordnung geschätzt und validiert.

Durch die Übertragung von drei Zulaufprozessen in den Rührkesselreaktor im Litermaßstab konnte die Produktion auf maximal 1621 nkat mL<sup>-1</sup> Xylanase- und 15,7 nkat mL<sup>-1</sup>  $\beta$ -Xylosidaseaktivität weiter gesteigert werden. Die höchste Xylanaseaktivität wurde in beiden Maßstäben für den gleichen Betriebspunkt bestimmt (Zugabe von 3,33 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Xylan ohne Ammoniumnitrat und Laktose im Zulaufmedium).

## **7 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Cellulaseproduktion mit *Trichoderma reesei* RUT-C30 im Zulaufverfahren**

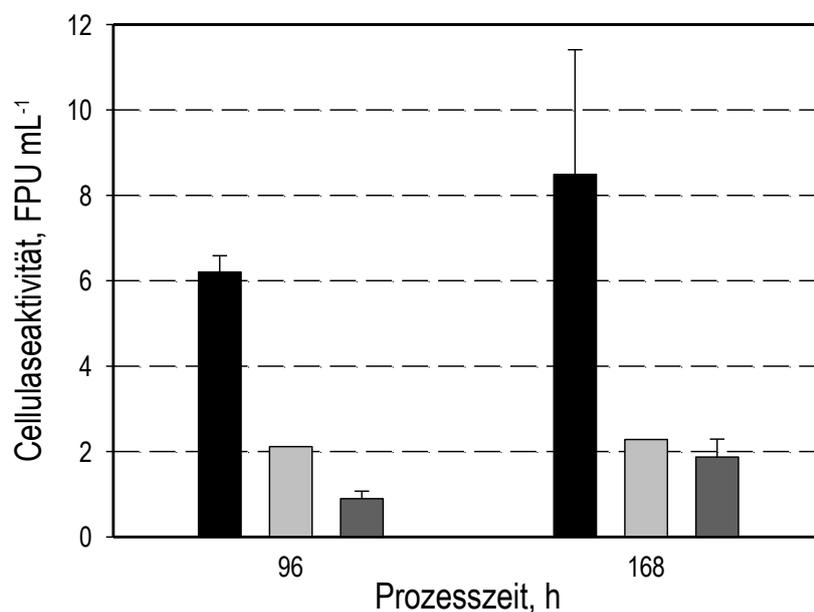
Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Kultivierung und die Optimierung von Zulaufmedien für Prozesse mit *B. subtilis* und *A. aculeatus* im Millilitermaßstab untersucht wurden, soll nun neben dem Zulaufmedium auch die Substratmenge im Satzmedium in die Optimierung einbezogen werden. Die Cellulaseproduktion mit *Trichoderma reesei* RUT-C30 mit einem feststoffhaltigen Medium dient als Beispiel, da die Produktion von Cellulasen derzeit im kommerziellen Maßstab vor allem mit Pilzen der Gattung *Trichoderma* geschieht (Saha et al., 2009). Wie bei der Produktion von Xylanasen werden für die Prozesse von *Trichoderma* häufig feststoffhaltige Medien verwendet, die zusammen mit dem Myzel der Pilze zu viskosen Reaktionslösungen führen (Martens et al., 1996). Deshalb ist die Verbesserung von Prozessbedingungen am besten im Rührkesselreaktor im Litermaßstab möglich. Optimierungen von Medienbestandteilen werden hingegen häufig auch in Schüttelkolben durchgeführt. In den wenigsten Veröffentlichungen wird jedoch von einer anschließenden Übertragung der Ergebnisse in den Rührkesselreaktor berichtet. Deshalb werden als erstes die Unterschiede in der Nutzung von Schüttelkolben und parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab für die Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 untersucht. Im Weiteren werden reaktionstechnische Untersuchungen zu den wichtigsten Ergebnissen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab durchgeführt

### **7.1 Voruntersuchungen**

Die Nutzung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel<sup>®</sup> PH-101) für die Kultivierung von Cellulaseproduzenten stellt eine Möglichkeit dar, definierte Medien zu untersuchen. Im Gegensatz zu komplexen Substraten aus der Natur wie Stroh oder Maisspindelgranulat enthält mikrokristalline Cellulose nur  $\beta(1-4)$ -verknüpfte Glukose und keine Hemicellulosen, Lignine oder Proteine, sodass in einfacher Weise Erkenntnisse über den Einfluss von weiteren Medienbestandteilen wie Stickstoffquellen oder Spurenelementen gewonnen werden können.

### 7.1.1 Einfluss des pH

Bei allen biotechnologischen Produktionsorganismen beeinflusst der pH die Produktivität und das Wachstum und stellt eine wichtige Prozessgröße in einer Kultivierung dar. Die Kultivierung von Pilzen findet im Gegensatz zu vielen Bakterien meist im sauren Milieu bei pH 3 bis pH 6 statt (Esterbauer et al., 1991). Bei der Produktion von Cellulasen mit heterologen Substraten hat der pH nicht nur einen direkten Einfluss auf die Produktivität und das Wachstum der Mikroorganismen sondern – durch die Aktivität der Cellulasen und die damit verbundene Freisetzung von Glukose – auch einen indirekten Einfluss auf die Wachstumsrate. Der Einfluss des pH ist in Abbildung 7.1 anhand der Enzymaktivitäten von verschiedenen Satzprozessen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab demonstriert.



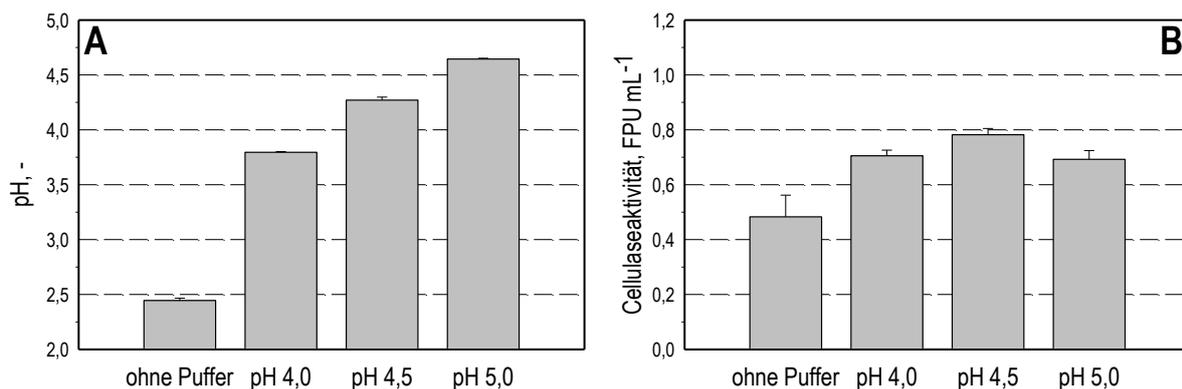
**Abbildung 7.1: Cellulaseproduktion von *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor mit variierendem pH (Satzverfahren)**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität von Satzprozessen von *T. reesei* RUT-C30 mit 60 g L<sup>-1</sup> mikrokristalline Cellulose als Substrat im Litermaßstab. Der pH wurde mit 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1 M NH<sub>4</sub>OH auf pH 4 (■) beziehungsweise pH 6 (□) geregelt. In einer weiteren Prozessbedingung wurde der pH mit 100 mM Natrium-Citrat-Puffer auf pH 4 (■) stabilisiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen setzen sich aus zwei Prozessen zusammen, bis auf den Prozess mit pH 6, der nur eine Kultivierung darstellt.

Die Enzymaktivitäten der produzierten Cellulasen wurden anschließend mit dem Filterpapiertest bestimmt. Bei zwei Prozessen wurde der pH mit 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1 M NH<sub>4</sub>OH beidseitig auf pH 4 beziehungsweise pH 6 geregelt. Zusätzlich wurde in dem dritten Ansatz der pH mit einem 100 mM Natrium-Citrat-Puffer auf pH 4 gepuffert. Mit einem Sollwert von pH 4 wurde die höchste Cellulaseaktivität gemessen (6,2 FPU mL<sup>-1</sup> nach 96 h und 8,5 FPU mL<sup>-1</sup> nach 168 h). Bei pH 6 und dem gepufferten Medium wurden dagegen nach 168 h nur 2,3 FPU mL<sup>-1</sup> und 1,9 FPU mL<sup>-1</sup> erreicht. Für den pH-ungeregelten Prozess konnte der pH durch den verwendeten Puffer relativ konstant bei pH 4 stabilisiert werden (Daten nicht dargestellt).

Die um Faktor 4,5 geringeren Cellulaseaktivitäten für das Satzverfahren mit Puffer gegenüber dem Satzverfahren mit Regelung auf pH 4 müssen daher unabhängig vom pH sein. Da der einzige Unterschied zwischen dem unregulierten Prozess und dem pH-geregelten Prozess im Korrekturmittel Ammoniumhydroxid lag, deutete die niedrigere Aktivität auf eine Stickstofflimitierung hin.

Auf Basis dieser Ergebnisse erschien es sinnvoll, eine Optimierung der Cellulaseproduktion mit einer pH-Regelung auf pH 4 durchzuführen. Da jedoch die Optimierung mit parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab und in Schüttelkolben durchgeführt werden sollte, die dort verwendeten optischen pH-Sensoren nur für Messungen von  $\text{pH} > 6$  ausgelegt waren und in Schüttelkolben keine Regelung möglich war, musste auf ein Puffersystem zurückgegriffen werden. Die Verwendung von Natrium-Citrat-Puffern in Konzentrationen von 50 - 200 mM wurde in Vorversuchen untersucht (Daten nicht dargestellt) und eine Pufferkonzentration von 100 mM gewählt. Für eine genauere Einstellung des pH wurden Satzmedien mit drei verschiedenen pH-Werten um pH 4,0 untersucht. Abbildung 7.2 zeigt die Cellulaseaktivität nach 96 h für Untersuchungen im Schüttelkolben und den zu diesem Zeitpunkt in den Reaktionsmedien gemessenen pH. Es zeigten sich signifikante Unterschiede: Ohne Puffer wurde eine Reduzierung des pH auf pH 2,4 beobachtet. Die gepufferten Medien wiesen hingegen nach 96 h einen pH zwischen pH 3,8 und pH 4,6 auf. Somit war auch in diesen Medien eine pH-Reduzierung während des Prozesses zu beobachten, die jedoch weniger ausgeprägt war. Mit dem Reaktionsmedium ohne Puffer wurde mit  $0,48 \pm 0,07 \text{ FPU mL}^{-1}$  die geringste Cellulaseaktivität bestimmt. Mit 100 mM Natrium-Citrat-Puffer pH 4,5 wurde hingegen die höchsten Cellulaseaktivität von  $0,78 \pm 0,02 \text{ FPU mL}^{-1}$  gemessen.



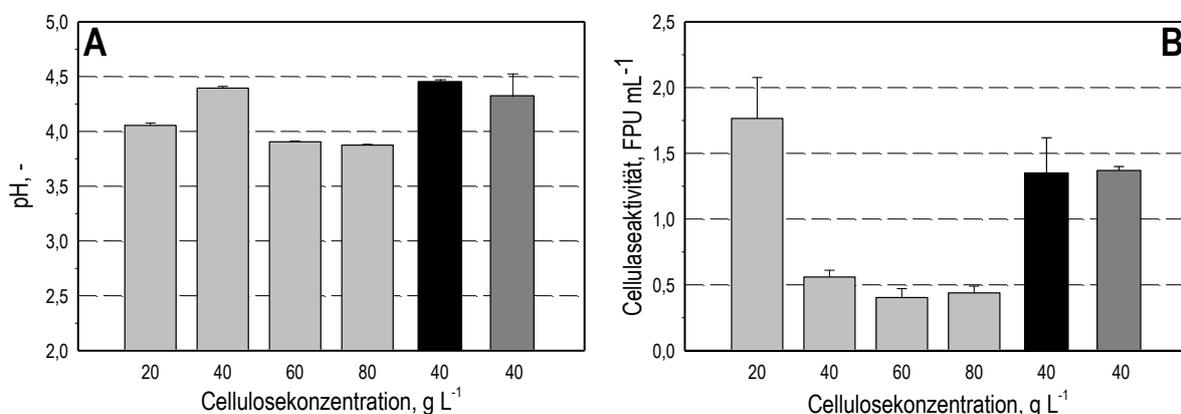
**Abbildung 7.2: Cellulaseaktivitäten von *T. reesei* RUT-C30 im Satzverfahren und finaler pH bei unterschiedlichen Puffern nach 96 h**

*T. reesei* RUT-C30 wurde mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose und 100 mM Natrium-Citrat-Puffer mit pH 4,0, pH 4,5 und pH 5,0 und einer Referenz ohne Puffer in jeweils zwei parallelen Schüttelkolben für 96 h kultiviert. Der finale pH der Prozesse (A) und die resultierende Cellulaseaktivität (B) sind in der Abbildung dargestellt.

### 7.1.2 Einfluss der Cellulosekonzentrationen

In der Literatur ist beschrieben, dass höhere Konzentrationen an cellulosehaltigen Feststoffen im Medium einen positiven Effekt auf die Produktion von Cellulasen mit *Trichoderma spp.* zeigen (Sternberg und Dorval, 1979; Esterbauer et al., 1991; Liming und Xueliang, 2004). Dieser Effekt konnte im Litermaßstab beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Es wurden Kultivierungen in Schüttelkolben mit mikrokristalliner Cellulose in den Konzentrationen von  $20 \text{ g L}^{-1}$  bis  $80 \text{ g L}^{-1}$  für 96 h durchgeführt und der Einfluss auf den pH und auf die Cellulaseaktivität am Ende des Prozesses gemessen.

In Abbildung 7.3-A lässt sich erkennen, dass die Cellulosekonzentrationen nur geringe Einflüsse auf den im Medium gemessenen pH nach 96 h hatten. Für Medien mit Konzentrationen von  $20, 60$  und  $80 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose wurde der pH zwischen pH 3,9 und pH 4,1 bestimmt. Für Prozesse mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose in den Satzmedien wurden hingegen sowohl in den Schüttelkolben, als auch in Rührkesselreaktoren im Liter- und Millilitermaßstab, ein pH  $\sim 4,4$  nach 96 h bestimmt. Diese Unterschiede im pH hatten jedoch nur wenig Einfluss auf die Cellulaseproduktion, da nur in den Schüttelkolben mit einer Konzentration von  $20 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose eine signifikante Aktivität von  $1,77 \text{ FPU mL}^{-1}$  erreicht werden konnte (Abbildung 7.3-B). Mit höheren Feststoffkonzentrationen wurden in den Schüttelkolben nur Aktivitäten von  $0,40 - 0,56 \text{ FPU mL}^{-1}$  produziert. Die Kultivierungen im Schüttelkolben zeigten hier Unterschiede zu den gerührten Reaktoren, da im Vergleich im Rührkesselreaktor mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose, Cellulaseaktivitäten von  $\sim 1,4 \text{ FPU mL}^{-1}$  ermittelt wurden.

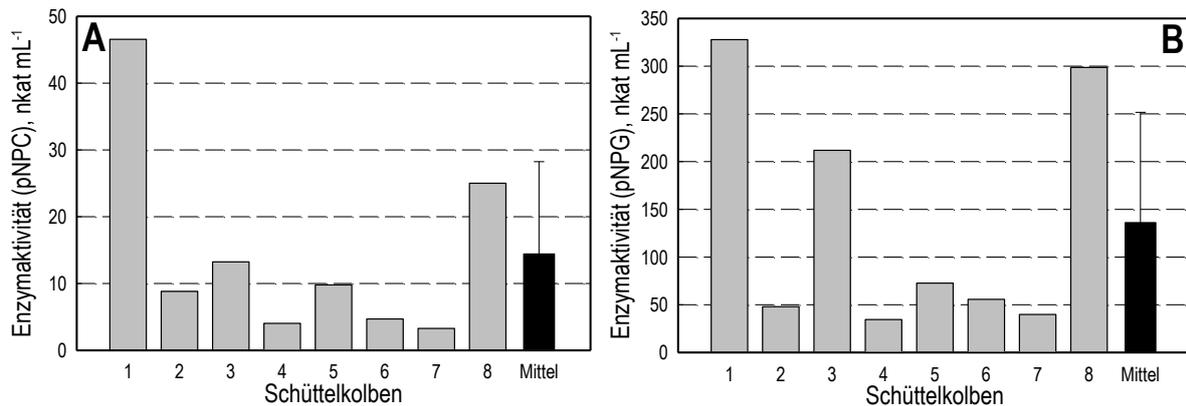


**Abbildung 7.3: Cellulaseaktivitäten und pH von *T. reesei* RUT-C30 bei unterschiedlichen Cellulosekonzentrationen nach 96 h**

Dargestellt sind der pH (A) und die Cellulaseaktivitäten (B) nach 96 h Prozesszeit von *T. reesei* RUT-C30 in Schüttelkolben (■) und Rührkesselreaktoren im Milliliter- (■) und Litermaßstab (■) mit 100 mM Natrium-Citrat-Puffer und variierenden Konzentrationen an mikrokristalliner Cellulose (Avicel PH-101). Mittelwerte und Standardabweichungen setzen sich aus jeweils zwei Schüttelkolben- beziehungsweise Literkultivierungen und 24 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zusammen.

### 7.1.3 Reproduzierbarkeit in Schüttelkolben und Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab

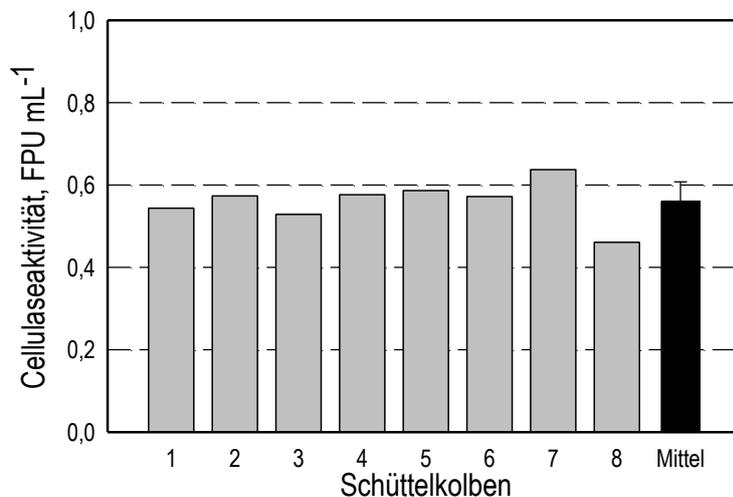
Zur Überprüfung der parallelen Reproduzierbarkeit wurden acht Schüttelkolben mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Satzverfahren über einen Zeitraum von 96 h mit *T. reesei* RUT-C30 betrieben. In Abbildung 7.4 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmungen nach 96 h dargestellt. Die relative Standardabweichung lag für die Messung der Cellobiohydrolase 1 (CBH1) mit dem Substrat *p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Cellobioside (pNPC) bei 96 %. Für die  $\beta$ -Glukosidaseaktivitäten konnten ebenfalls keine reproduzierbaren Ergebnisse ermittelt werden (Standardabweichung 85 %).



**Abbildung 7.4: Enzymaktivitäten von *T. reesei* RUT-C30 in parallel betriebenen Schüttelkolben**

Dargestellt sind die Enzymaktivitäten von CBH1 gegenüber dem Substrat *p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Cellobioside (pNPC) (A) und der  $\beta$ -Glukosidase gegenüber *p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Glukopyranoside (pNPG) (B) von acht parallelen Schüttelkolben mit *T. reesei* RUT-C30 mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Medium und der Mittelwert.

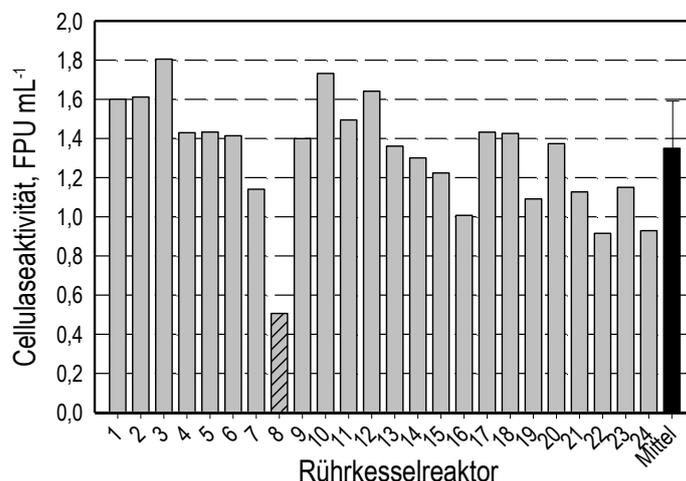
Im Gegensatz zu den nicht reproduzierbaren Einzelenzymaktivitäten, zeigte die Messung der Filterpapieraktivität eine gute parallele Reproduzierbarkeit (Standardabweichung 8,5 %, Abbildung 7.5). Dabei lagen die Aktivitäten zwischen  $0,46 \text{ FPU mL}^{-1}$  und  $0,64 \text{ FPU mL}^{-1}$ , so dass eine mittlere Cellulaseaktivität von  $0,56 \text{ FPU mL}^{-1}$  ermittelt wurde.



**Abbildung 7.5: Cellulaseaktivität von *T. reesei* RUT-C30 in parallel betriebenen Schüttelkolben**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität (FPU) nach 96 h in acht parallelen Schüttelkolben mit *T. reesei* RUT-C30 mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Medium und der Mittelwert.

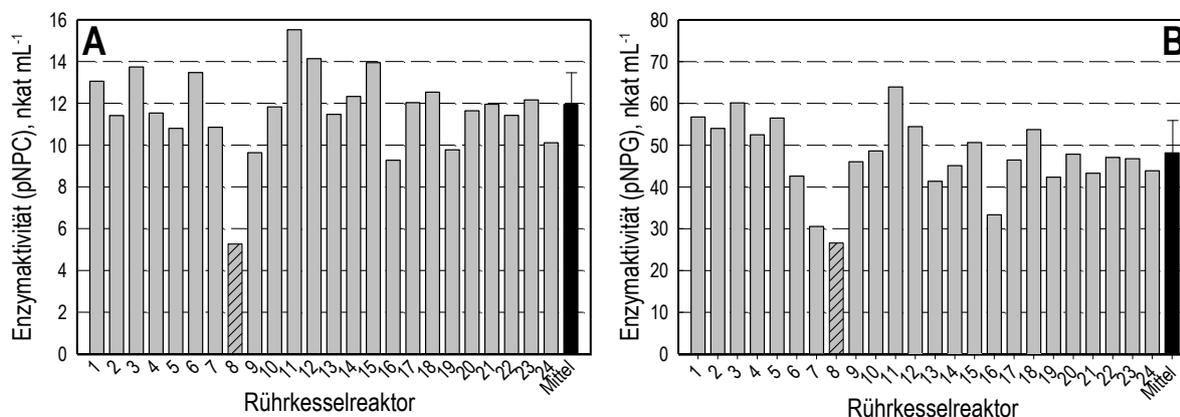
Zur Quantifizierung der parallelen Reproduzierbarkeit der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab, wurden 24 Rührkesselreaktoren ebenfalls mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Satzverfahren betrieben. Die Filterpapieraktivitäten in Abbildung 7.6 zeigten, mit einem Mittelwert von  $1,35 \text{ FPU mL}^{-1}$ , mit einer Standardabweichung von 18 %, eine mehr als doppelt so hohe Aktivität verglichen mit den Schüttelkolbenexperimenten. Die maximale Aktivität lag dabei bei  $1,81 \text{ FPU mL}^{-1}$ .



**Abbildung 7.6: Cellulaseaktivität von *T. reesei* RUT-C30 in parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab nach 96 h**

Dargestellt sind die Cellulaseaktivitäten (FPU) im Medium von 24 parallelen Rührkesselreaktoren (▤) mit *T. reesei* RUT-C30 mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Medium und deren zugehöriger Mittelwert (■) ohne Berücksichtigung von Reaktor 8 (▨).

Für die 24 parallelen Rührkesselreaktoren wurden weiterhin, wie für die Schüttelkolben, die Aktivitäten der CBH1 und der  $\beta$ -Glukosidase nach 96 h bestimmt. Im Vergleich zu den Schüttelkolbenergebnissen wurden für die Enzymaktivitäten in den parallelen Rührkesselreaktoren, weitaus bessere Reproduzierbarkeiten gemessen: Standardabweichungen der CBH1 von 13 % mit einer mittleren Enzymaktivität von  $11,9 \text{ nkat mL}^{-1}$  und Standardabweichungen von 16 % für die  $\beta$ -Glukosidase mit einer mittleren Aktivität von  $48,2 \text{ nkat mL}^{-1}$  (Abbildung 7.7).

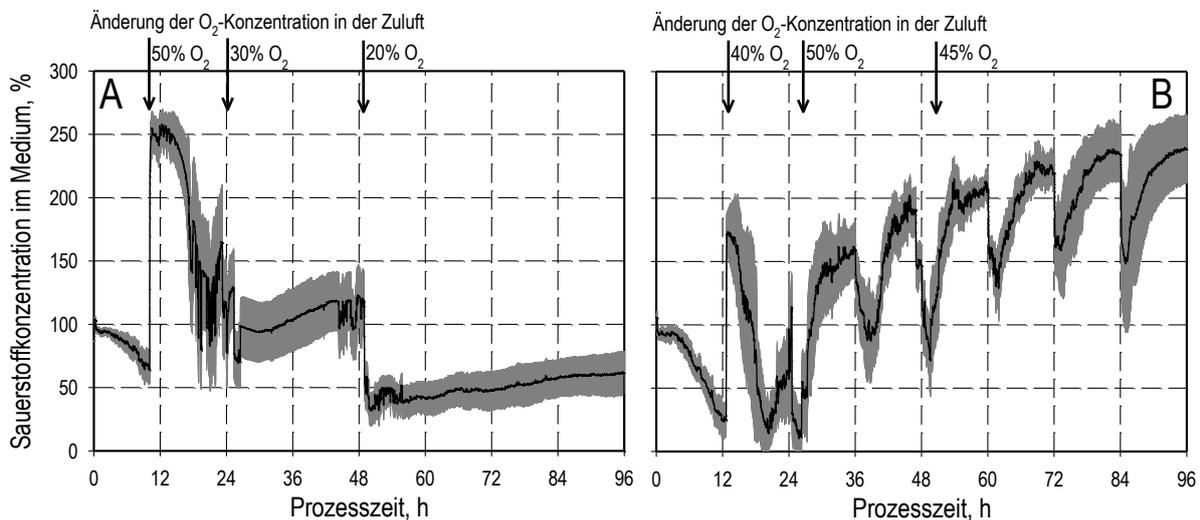


**Abbildung 7.7: Enzymaktivitäten von *T. reesei* RUT-C30 in parallelen Rührkesselreaktoren nach 96 h**

Dargestellt sind die Enzymaktivitäten der CBH1 gegenüber dem Substrat pNPC (A) und  $\beta$ -Glukosidase gegenüber pNPG (B), von 24 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab (▤) mit *T. reesei* RUT-C30 mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Medium und deren zugehöriger Mittelwert (■) ohne Berücksichtigung von Reaktor 8 (▨).

In den Rührkesselreaktoren lassen sich die Sauerstoffkonzentrationen im Medium ( $pO_2$ ) online messen. Diese geben bereits während der Kultivierung einen Hinweis auf die Reproduzierbarkeit der einzelnen Reaktoren. Am Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium der 24 parallelen Rührkesselreaktoren mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose lässt sich die in den ersten 24 h stattfindende Satzphase durch eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration erkennen (Abbildung 7.8-A). Diese Abnahme wurde bei einer Prozesszeit von 11 h durch einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration von 60 % Luftsättigung auf 250 % unterbrochen. An dieser Stelle wurde reiner Sauerstoff in die Zuluft gemischt, um eine ausreichende Sauerstoffkonzentration in allen Reaktoren zu gewährleisten. Im weiteren Verlauf wurde der Sauerstoff bei 24 h und 48 h wieder reduziert, um Sauerstoffkonzentrationen von unter 100 % Luftsättigung zu erreichen.

Zum Vergleich ist in Abbildung 7.8-B der  $pO_2$ -Verlauf einer Zulaufkultivierung dargestellt. Bei dieser lässt sich erkennen, dass der gelöste Sauerstoff zum Ende der Satzphase bei 24 h gegen 0 % Luftsättigung geht. Zudem lassen sich durch die mit einer Abtastzeit von 12 h zugegebene Laktose, Änderungen im Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen erkennen. Im Vergleich der beiden  $pO_2$ -Verläufe wird deutlich, dass in die Rührkesselreaktoren mit unterschiedlichen Prozessbedingungen auch unterschiedlich viel Sauerstoff eingetragen werden muss. Die Gaszufuhr erfolgt in den parallelen Rührkesselreaktoren für alle Reaktoren identisch. Eine Änderung in der Gaszusammensetzung muss deshalb auf den Prozess mit dem höchsten Sauerstoffbedarf angepasst werden. Hierdurch stellen sich jedoch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in den Flüssigphasen der Rührkesselreaktoren ein.

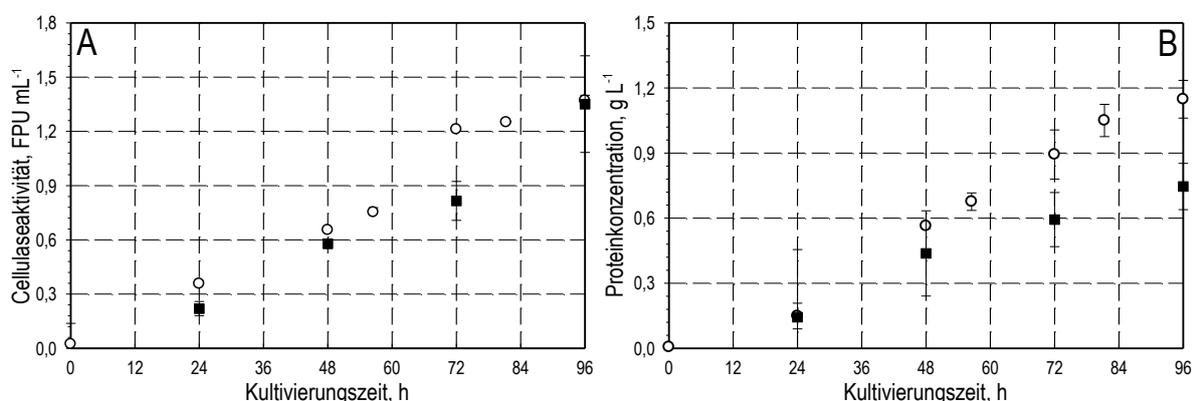


**Abbildung 7.8:  $pO_2$ -Verlauf von parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab**

Dargestellt ist der  $pO_2$ -Verlauf einer Satzphase (A) und eines Zulaufprozesses mit Laktose (B) zur Produktion von Cellulasen mit *T. reesei* RUT-C30 mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Satzmedium. Der  $pO_2$ -Verlauf (—) und dessen Standardabweichung (■) setzen sich für (A) aus 24 und für (B) aus sechs parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zusammen. In die Begasung wurde reiner Sauerstoff mit einem maximalen Anteil von 40 % hinzugegeben. Die Zeitpunkte von Änderungen der Gaszusammensetzung mit der gesamten Sauerstoffkonzentration (aus  $O_2$  und Luft) sind mit Pfeilen im Diagramm markiert. Der Zulauf in den Prozess in (B) wurde ab 24 h mit einer Abtastzeit von 12 h zugegeben.

### 7.1.4 Prozessvergleich zwischen Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab

Neben der parallelen Reproduzierbarkeit ist die Maßstabsübertragung zwischen den Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab wichtig. Diese wurde, auf Grund der geometrischen Unterschiede der Rührorgane für die Cellulaseproduktion nicht anhand der klassischen Kriterien ( $P \cdot V^l = \text{const.}$  oder  $k_{LA} = \text{const.}$ ) durchgeführt, sondern anhand eines  $pO_2 > 20\%$ . Hierdurch unterschieden sich die Leistungseinträge in den Rührkesselreaktoren der Prozesse (vgl. Tabelle 4.19). Wie bereits in Abbildung 7.3 gezeigt, konnte für die Referenzbedingungen mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose im Satzmedium keine übereinstimmende Cellulaseaktivität zwischen Satzprozessen in Schüttelkolben und den Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab nach 96 h gefunden werden. Die Prozesse in den Rührkesselreaktoren waren hingegen vergleichbar. In den Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab zeigten sich bis zu einer Prozesszeit von 48 h vergleichbare Zunahmen der Cellulaseaktivitäten mit  $\sim 0,3 \text{ FPU mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Abbildung 7.9). Zum Ende der Prozesse bei 96 h lagen die Filterpapieraktivitäten in beiden Maßstäben bei  $\sim 1,35 \text{ FPU mL}^{-1}$ . Für die Proteinkonzentrationen im Medium zeigten sich ebenfalls Übereinstimmungen bis 48 h. Nach 96 h waren jedoch Unterschiede vorhanden:  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  Protein im Millilitermaßstab und  $1,15 \text{ g L}^{-1}$  im Litermaßstab.



**Abbildung 7.9: Cellulaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen von *T. reesei* RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Milliliter und Litermaßstab (Satzkultivierungen)**

Dargestellt ist der Verlauf der Cellulaseaktivität (A) und der Proteinkonzentration (B) im Milliliter- (■) und Litermaßstab (○). Die dargestellten Ergebnisse stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus jeweils drei (24 - 72 h) und 15 parallelen Rührkesselreaktoren (96 h) im Millilitermaßstab, sowie zwei sequenziellen Kultivierungen im Litermaßstab dar. Das Medium enthielt  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalline Cellulose und wurde mit  $100 \text{ mM}$  Natrium-Citratpuffer pH 4,5 gepuffert.

### Diskussion

Bei der Betrachtung des pH konnte in Prozessen ohne Puffer eine pH-Reduzierung auf  $\text{pH} \sim 2$  gemessen werden. Diese Reduzierung wird in der Literatur für vergleichbare Prozesse mit *T. reesei* beschrieben (Sternberg, 1976) und führt zu einer Reduzierung der Cellulaseproduktion. Durch das Puffern des Mediums sank der pH während des Prozesses

zwar weiterhin, lag jedoch in einem Bereich von pH 3,5 bis pH 4,5, welcher von vielen Autoren als der ideale Produktionsbereich für Cellulasen mit *T. reesei* beschrieben wird (Ryu und Mandels, 1980; Esterbauer et al., 1991).

Da hohe Feststoffkonzentrationen des Substrats bis  $80 \text{ g L}^{-1}$  für die Produktion von Cellulasen im Rührkesselreaktor eine relevante Konzentration darstellen (Ryu und Mandels, 1980), wurden diese auch in Schüttelkolbenprozessen untersucht. Hier kam es jedoch durch die Erhöhung der Feststoffkonzentration, im Gegensatz zum Rührkesselreaktor, zu einer Reduzierung der Cellulaseproduktion. Die geringere Cellulaseaktivität in den Schüttelkolben mit hohem Feststoffgehalt wird wahrscheinlich durch die Verschlechterung des Sauerstofftransports in die Flüssigphase beeinflusst sein. Aufgrund von Sauerstofflimitierungen kommt es bei *T. reesei* zu einer Reduktion in der Cellulaseproduktion (Marten et al, 1996).

Häufig wird eine relative Übereinstimmung von CBH1- und Filterpapieraktivitäten beobachtet, wie es für die Experimente zur Reproduzierbarkeit der Cellulaseproduktion im Rührkesselreaktor der Fall war. Diese lässt sich auch aus der Zusammensetzung der Cellulasen von *T. reesei* erklären. Dabei liegt die Menge des Enzyms CBH1 bei 60 % der ins Medium sekretierten Cellulasen und macht dadurch auch in dem Filterpapiertest einen signifikanten Anteil der Aktivität aus (Merino und Cherry, 2007).

Bei dem Vergleichen von Prozessen im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab kam es trotz der gleichen Cellulaseaktivitäten zu Unterschieden in den Proteinkonzentrationen. Das Verhältnis aus der Filterpapieraktivität und der Proteinkonzentration ist im Regelfall gleichbleibend und liegt für die meisten *Trichoderma spp.* bei  $0,5 - 1,0 \text{ FPU mg}^{-1}$ , wobei auch schon  $6,2 \text{ FPU mg}^{-1}$  beschrieben wurden (Domingues et al., 2001). Die spezifische Cellulaseaktivität hängt dabei stark von der verwendeten Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen ab, die meistens nach Lowry et al. (1951) durchgeführt wird. Wird jedoch, wie in den hier beschriebenen Ergebnissen, eine gleichbleibende Methode für verschiedene Prozesse verwendet, so bedeutet die Änderung in der spezifischen Aktivität auch eine Änderung in der Proteinzusammensetzung im Medium. Dabei könnte es sich bei den neben den Cellulasen gemessenen Proteinen zum einen um weitere sekretierte Proteine wie zum Beispiel Proteasen handeln. Zum anderen können dies auch Zellproteine sein, die durch die höheren Scherkräfte im Rührkesselreaktor im Litermaßstab freigesetzt wurden (Sheir-Neiss, 1984).

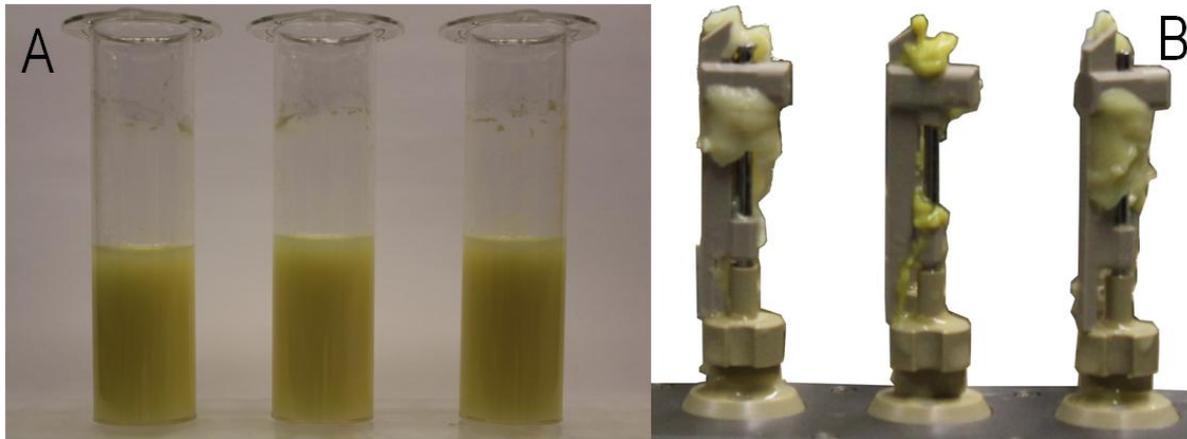
## 7.2 Optimierung

Für die Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 sollte analog zur Optimierung der Xylanaseproduktion (Kapitel 6) ein statistischer Versuchsansatz verwendet werden (Kapitel 4.4). Zur Identifikation der Parameter des Polynoms zweiten Grades mussten für jede Variable drei verschiedene Konzentrationen oder Zulaufraten betrachtet werden. Damit das Optimum im experimentellen Raum liegt, musste die Obergrenze über dem vermuteten Optimum liegen. Die Optimierung wurde sowohl im Schüttelkolben, als auch im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab mit den zuvor untersuchten Bedingungen mit einem 100 mM Natrium-Citratpuffer pH 4,5 und 10 g L<sup>-1</sup> Laktose im Satzmedium durchgeführt. Für die angestrebte Optimierung wurde 40 g L<sup>-1</sup> kristalline Cellulose als mittlere und 0 g L<sup>-1</sup> sowie 80 g L<sup>-1</sup> als Unter- beziehungsweise Obergrenze der Feststoffkonzentration im Satzmedium ausgewählt. Damit stellte ein Satzprozess mit einer Cellulosekonzentration von 40 g L<sup>-1</sup> die Referenzbedingung dar. Über das Zulaufmedium wurden Laktose als schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle dosiert. Wie für die Cellulose wurde die untere Zulauftrate für die beiden Variablen auf 0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> gesetzt. Mit den gewählten Obergrenzen ergaben sich für Laktose Zulaufraten von 0 – 15 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> und für Ammoniumsulfat von 0 – 5 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Der Zulauf erfolgte ab 24 h nach der Satzphase mit einer Abtastrate von 12 h, sodass am Ende der Optimierung insgesamt 300 mL L<sup>-1</sup> Zulaufmedium in jeden Reaktor dosiert wurden. Für die Identifikation der Parameter des quadratischen Polynoms (Gleichung 4.5) wurden alle 15 in Tabelle 4.22 und Tabelle 4.23 aufgeführten Betriebspunkte parallel im Zweifachansatz (Schüttelkolben) oder Dreifachansatz (Rührkesselreaktoren) kultiviert und danach nochmals wiederholt. Das Experiment 15, das den Mittelpunkt des Beobachtungsraums darstellt (Abbildung 4.5), wurde dabei in den Rührkesselreaktoren sechsfach parallel durchgeführt. Der Mittelwert aus den beiden sequentiellen Prozessen mit jeweils zwei Ansätzen wurde für die Erstellung des Modells verwendet.

Im Gegensatz zu Kultivierungen im Schüttelkolben konnte die Substratdosierung in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab automatisiert über einen Laborroboter erfolgen. Neben der Automatisierung gab es durch die in den Reaktoren enthaltenen optischen Sensoren die Möglichkeit, den im Medium gelösten Sauerstoff online auszulesen (vgl. Kapitel 7.1.3 und Abbildung 7.8). Durch die Zugabe von maximal 40 % reinem Sauerstoff in die Zuluft wurde der im Medium gelöste Sauerstoff über 20 % gehalten. Ausschlaggebend für die Zugabe war dabei jeweils der Rührkesselreaktor mit dem niedrigsten Sauerstoffanteil im Medium. Während der Kultivierung erfolgte eine Reduktion des Sauerstoffanteils in der Zuluft, um die Konzentration möglichst unter 100 % Luftsättigung zu halten.

Während der durchgeführten Optimierung wurden zum Prozessende die Trockenmasse und der pH bestimmt. Die Biotrockenmasse kann bei Kultivierungen mit Feststoff jedoch nicht einfach gravimetrisch bestimmt werden, da die Feststoffe mit der Biomasse bei der gravimetrischen Abtrennung vom Medium ebenfalls abgetrennt werden. Die Trockenmasse

gibt in diesem Fall also die Summe aus Biomasse und der im Medium verbliebenen mikrokristallinen Cellulose wieder. Wandwachstum fand bei *T. reesei* im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab kaum statt, dafür war das Wachstum an den Rührorganen vorhanden (Abbildung 7.10).



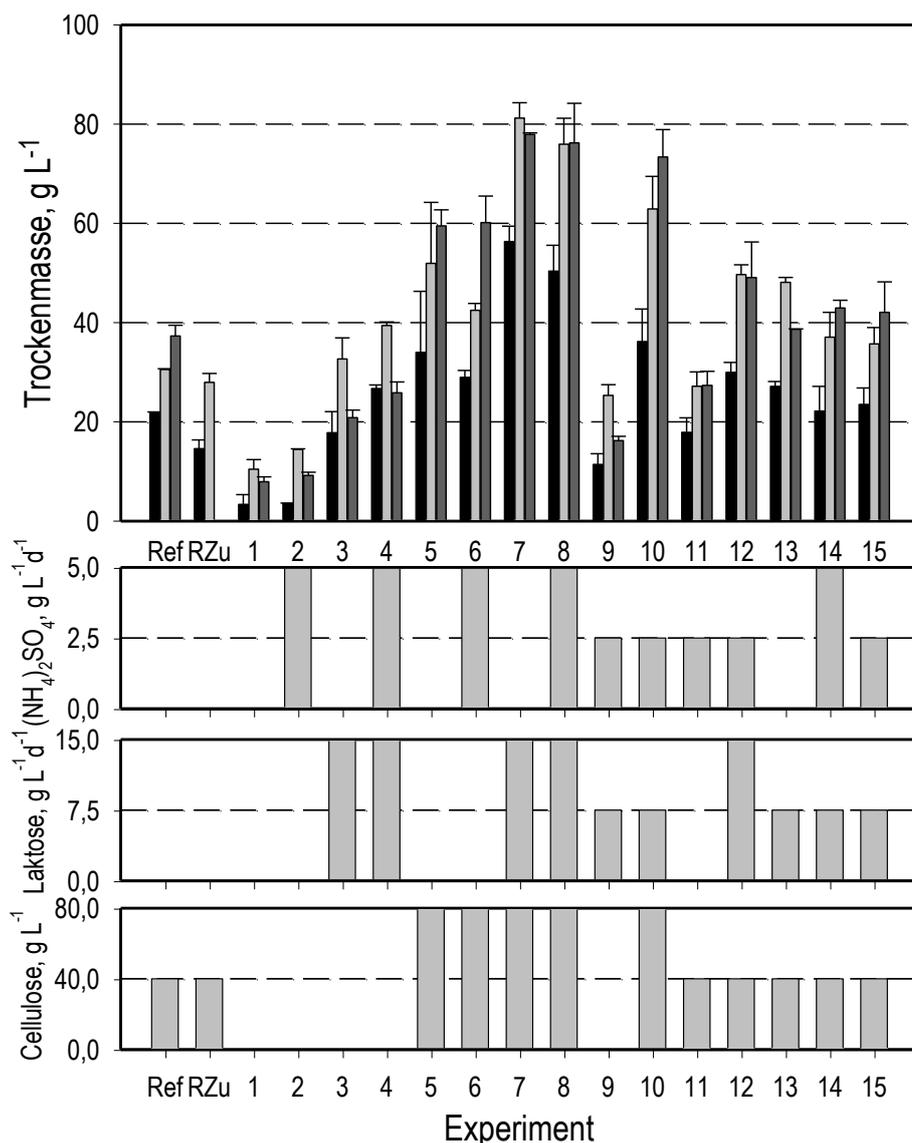
**Abbildung 7.10: Reaktoren und Rührer aus einer Kultivierung mit *T. reesei* RUT-C30 zur Optimierung der Cellulaseproduktion im Millilitermaßstab**

Dargestellt sind Reaktoren (A) und 3 Rührer (B) nach 96 h von jeweils 3 parallelen Prozessen mit denselben Bedingungen.

Neben den Betriebspunkten der Optimierung und der Referenz wurde in den Rührkesselreaktoren ein weiterer Prozess mit einem substratlosen Zulauf (RZu) untersucht. Dieser Betriebspunkt war ein Satzprozess mit der gleichen Volumenerhöhung wie die Experimente der Optimierung. Aus dem Vergleich der Trockenmassekonzentrationen im Medium nach 96 h zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus den Schüttelkolben und den Rührkesselreaktoren (Abbildung 7.11).

Die gemessenen Konzentrationen in den Rührkesselreaktoren wiesen im Mittel nur 62 % der Trockenmassekonzentration auf, wie sie in den Schüttelkolben bestimmt wurden. Die Referenz und Experiment 10 zeigten die höchsten Unterschiede von ~ 50 %. Wenn die Trockenmasse am Rührorgan hinzuaddiert wurde, wies diese Summe als Mittel über alle Experimente im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab eine Konzentration von  $42,3 \text{ g L}^{-1}$  auf und war mit der mittleren Konzentration der Schüttelkolben von  $41,8 \text{ g L}^{-1}$  identisch. Im Durchschnitt wurde also ~ 40 % der Trockenmasse an den Rührorganen wiedergefunden.

Aufgrund der mikrokristallinen Cellulose im Medium ließen sich nur innerhalb der experimentellen Bedingungen mit gleicher Startkonzentration an Cellulose Vergleiche zur Biomasse anstellen. Für Experimente ohne Cellulose im Satzmedium (Experiment 1 – 4 und 9) war durch die Dosierung von Laktose eine deutliche Zunahme der Biomasse erkennbar. Daher zeigten Experiment 1 und 2 nur eine Biomassekonzentration von  $\sim 10 \text{ g L}^{-1}$ , wohingegen in Experiment 3, 4 und 9, Biotrockenmassekonzentrationen von 20 -  $40 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt wurden. Die Konzentrationen in den Rührkesselreaktoren waren deutlich höher als in den Schüttelkolben und ein Zusammenhang zwischen der Menge der zugegebenen Laktose und der Biomasse war erkennbar.



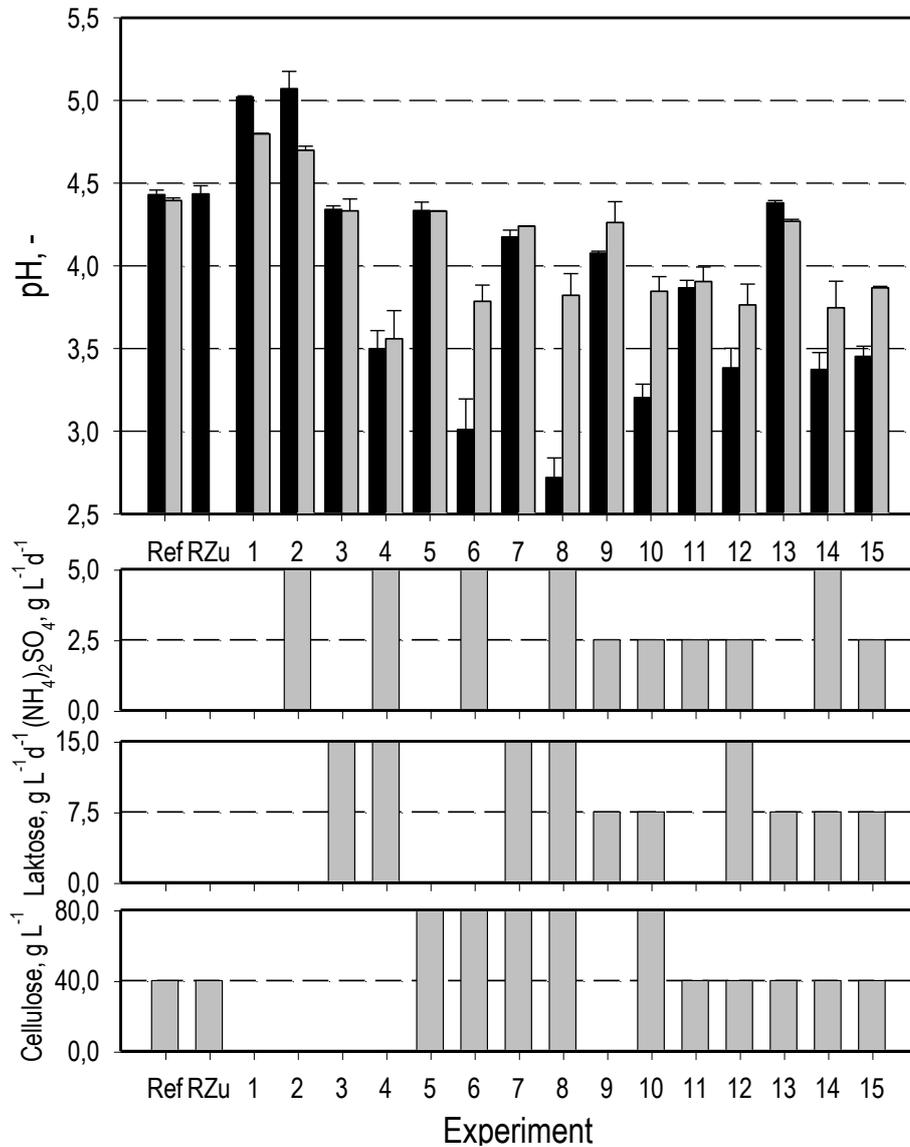
**Abbildung 7.11: Trockenmasskonzentration von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit**

Dargestellt sind die Trockenmasskonzentrationen der 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Cellulaseproduktion, von Satzkultivierungen als Referenz (Ref) und Satzkultivierungen mit Volumenerhöhung (RZu) mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h. Die Trockenmasskonzentration im Medium im Rührkesselreaktor (■) und in Schüttelkolben (■) wird verglichen. Zusätzlich ist die Summe aus suspendierter Trockenmasse und Trockenmasse am Rührorgan für die Rührkesselreaktoren (■) dargestellt. Die Trockenmasse setzt sich aus der Biomasse und der mikrokristallinen Cellulose zusammen. Für jedes Experiment ist der Mittelwert aus zwei sequenziellen Experimenten dargestellt. Die Ergebnisse der Referenz (Ref) stammen aus 24 parallelen Rührkesselreaktoren, in denen keine Volumenänderung stattfand, wohingegen die Referenz mit Volumenausgleich (RZu) aus drei parallelen Prozessen stammt. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Prozesse betrug immer  $300 \text{ mL L}^{-1}$ . Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufraten von Laktose und Ammoniumsulfat für die 15 Experimente dargestellt.

Für die Experimente 5 - 8 und 10 mit Startkonzentrationen von  $80 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalliner Cellulose und die Experimente mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose im Satzmedium (Experimente 11 – 15) ließen sich ebenfalls ein Einfluss der Laktose beobachten. Experiment 5 und 6 zeigten Trockenmasskonzentrationen zwischen  $40 \text{ g L}^{-1}$  und  $60 \text{ g L}^{-1}$  und die Experimente mit Laktosedosierung Konzentrationen von  $60 - 80 \text{ g L}^{-1}$ . Dabei war kein weiterer Einfluss des

Ammoniumsulfats erkennbar. Festzuhalten ist, dass es Unterschiede in der Trockenmassekonzentration in der Flüssigphase zwischen den beiden Systemen gab und in den Rührkesselreaktoren ein großer Teil der Trockenmasse immobilisiert vorlag.

Neben den Trockenmassekonzentrationen wurde der pH nach 96 h für die Experimente in den Schüttelkolben und Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab bestimmt (Abbildung 7.12).



**Abbildung 7.12: pH von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit**

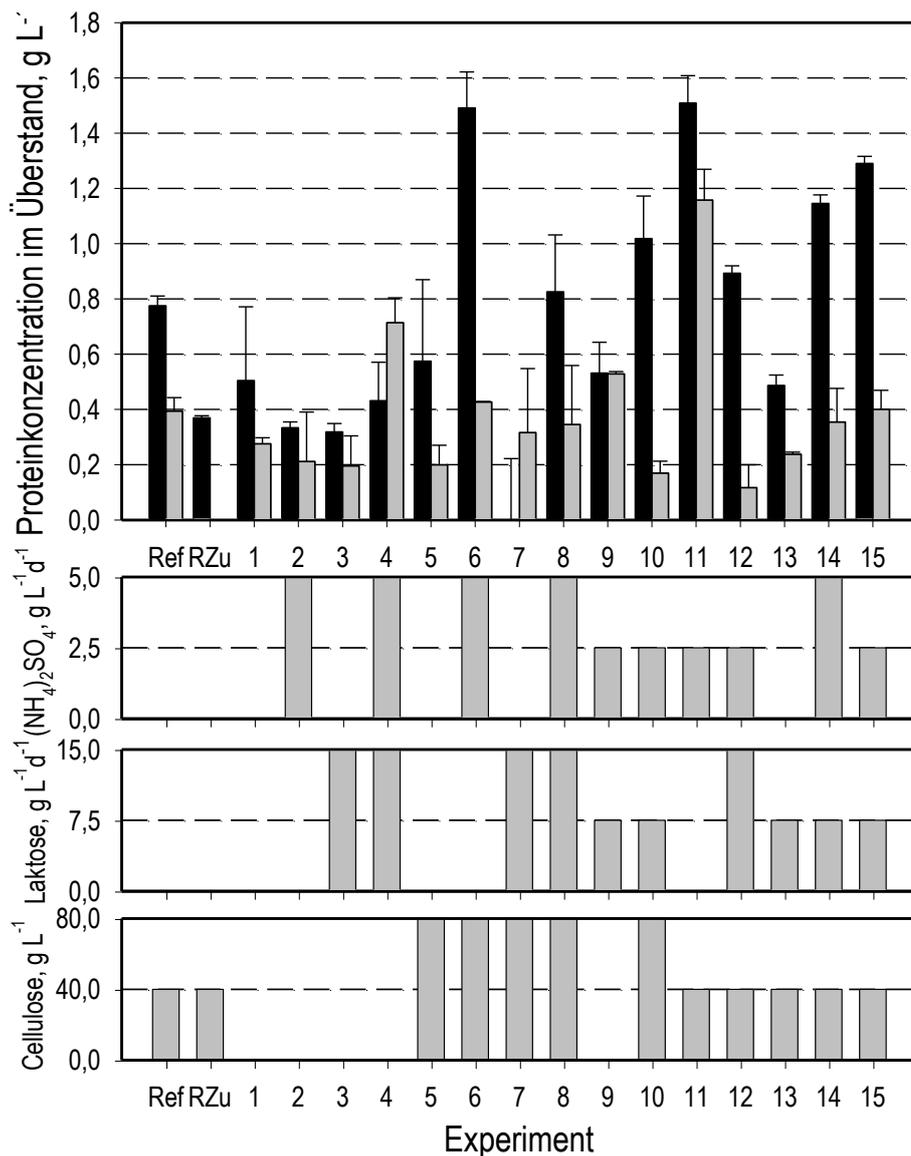
Dargestellt ist der pH der 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Cellulaseproduktion, von Satzkultivierungen als Referenz (Ref) und Satzkultivierungen mit Volumenerhöhung (RZu) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (■) und im Schüttelkolben (□) nach 96 h. Für jedes Experiment ist der Mittelwert aus zwei sequenziellen Experimenten dargestellt. Die Ergebnisse der Referenz (Ref) stammen aus 24 parallelen Rührkesselreaktoren, in denen keine Volumenänderung stattfand, wohingegen die Referenz mit Volumenausgleich (RZu) aus drei parallelen Prozessen stammt. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Prozesse betrug immer 300 mL L<sup>-1</sup>. Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufarten von Laktose und Ammoniumsulfat für die 15 Experimente dargestellt.

Der finale pH der Prozesse lag für die 15 experimentellen Bedingungen im Schüttelkolben im Bereich von pH 3,5 bis pH 4,8 und in den Rührkesselreaktoren zwischen pH 2,7 und pH 5,1. In beiden Systemen lag der Mittelwert der relativen Standardabweichungen bei 2 % und die Referenzbedingungen hatten nach 96 h einen pH von pH 4,4. Einige Bedingungen wiesen in den Rührkesselreaktoren einen gegenüber den Schüttelkolben reduzierten pH auf. Dadurch ergab sich für die 15 Bedingungen ein Mittelwert von pH 3,9, im Vergleich zu pH 4,1 in den Schüttelkolben.

Bis auf Experiment 2 und 9 wiesen dabei alle Experimente mit Ammoniumsulfat im Zulauf einen  $\text{pH} < 4,0$  auf. Der pH ließ sich daher auf einen stärkeren Verbrauch des Ammoniumsulfats und die Freisetzung der Sulfatanionen zurückführen. Dies lässt sich besonders an den Betriebspunkten 6, 8, 10, 12, 14 und 15 mit Ammoniumsulfat im Zulauf erkennen, die im Rührkesselreaktor im Mittel um pH 0,6 mehr im sauren Milieu waren, als in den Schüttelkolben. Besonders bei Experiment 6, 8 und 10 mit  $80 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose, war der pH im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab stark gegenüber den Schüttelkolben erniedrigt. Die verstärkte Reduktion des pH deutete auf eine höhere metabolische Aktivität in den Prozessen und ein verstärktes Wachstum in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab gegenüber den Schüttelkolben hin.

Die Proteinkonzentrationen in den Medien nach 96 h zeigten für einige Prozesse eine Steigerung der extrazellulären Proteinmenge gegenüber der Referenz (Abbildung 7.13).

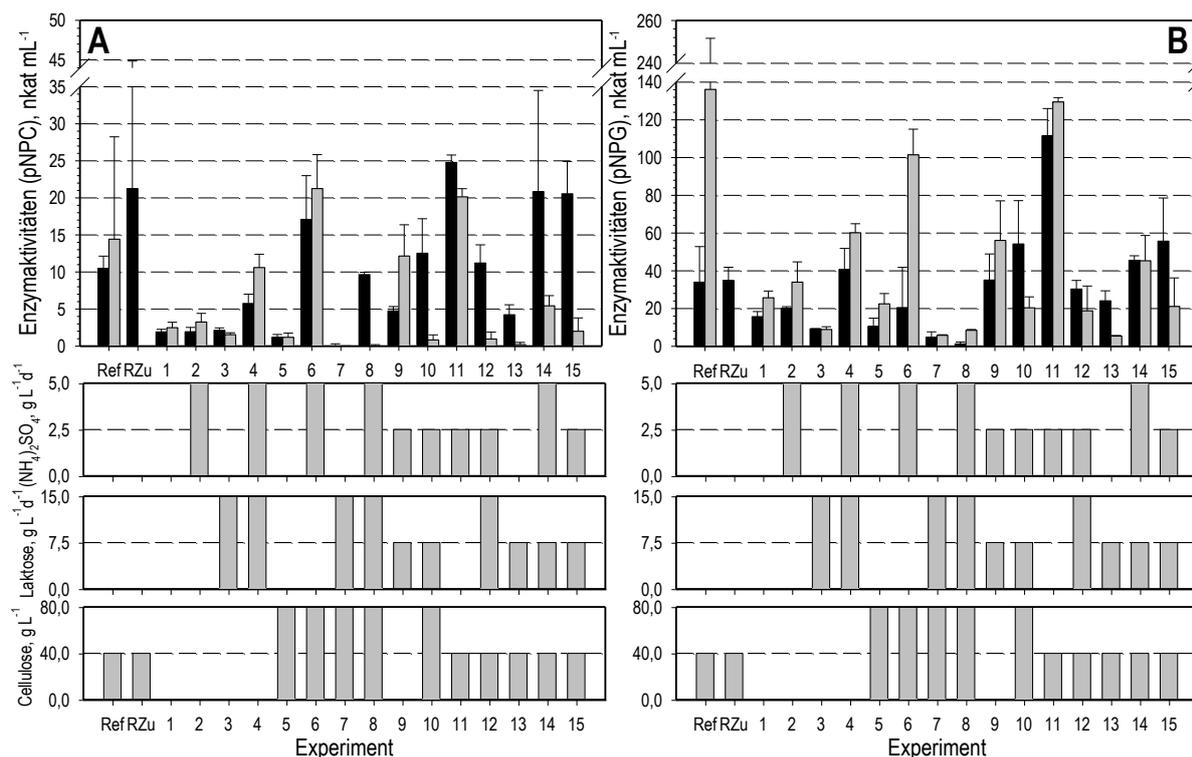
In den Schüttelkolben konnte dabei nur mit den experimentellen Bedingungen 4, 9 und 11 eine extrazelluläre Proteinkonzentration von über  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden, wohingegen in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab nur fünf experimentelle Bedingungen eine Konzentration niedriger als  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Protein hatten. Die mittlere Proteinkonzentration für alle Experimente war in den Rührkesselreaktoren mit  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  daher auch doppelt so hoch wie in den Schüttelkolben mit  $0,38 \text{ g L}^{-1}$  Protein. Bedingung 11 zeigte mit  $1,51 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$  im Rührkesselreaktor und  $1,16 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$  in den Schüttelkolben jeweils die höchste Proteinkonzentration. Damit konnte eine Steigerung um 94 % im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab und 197 % im Schüttelkolben gegenüber den zugehörigen Satzprozessen erreicht werden.



**Abbildung 7.13: Proteinkonzentrationen von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit**

Dargestellt ist die Proteinkonzentration im Medium der 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Cellulaseproduktion, von Satzkultivierungen als Referenz (Ref) und Satzkultivierungen mit Volumenerhöhung (RZu) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (■) und im Schüttelkolben (□) nach 96 h. Für jedes Experiment ist der Mittelwert aus zwei sequenziellen Experimenten dargestellt. Die Ergebnisse der Referenz (Ref) stammen aus 24 parallelen Rührkesselreaktoren, in denen keine Volumenänderung stattfand, wohingegen die Referenz mit Volumenausgleich (RZu) aus drei parallelen Prozessen stammt. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Prozesse betrug immer 300 mL L<sup>-1</sup>. Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufdaten von Laktose und Ammoniumsulfat für die 15 Experimente dargestellt.

Die Enzymaktivitäten der CBH1 und der  $\beta$ -Glukosidase zeigten in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab und in den Schüttelkolben bei den meisten experimentellen Bedingungen vergleichbare Aktivitäten (Abbildung 7.14).



**Abbildung 7.14: Enzymaktivitäten von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit**

Dargestellt sind die Enzymaktivitäten der CBH1 gegenüber pNPC (A) und der  $\beta$ -Glukosidase gegenüber pNPG (B) im im Medium der 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Cellulaseproduktion, von Satzkultivierungen als Referenz (Ref) und Satzkultivierungen mit Volumenerhöhung (RZu) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (■) und im Schüttelkolben (▒) nach 96 h. Für jedes Experiment ist der Mittelwert aus zwei sequenziellen Experimenten dargestellt. Die Ergebnisse der Referenz (Ref) stammen aus 24 parallelen Rührkesselreaktoren, in denen keine Volumenänderung stattfand, wohingegen die Referenz mit Volumenausgleich (RZu) aus drei parallelen Prozessen stammt. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Prozesse betrug immer  $300 \text{ mL L}^{-1}$ . Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufraten von Laktose und Ammoniumsulfat für die 15 Experimente dargestellt.

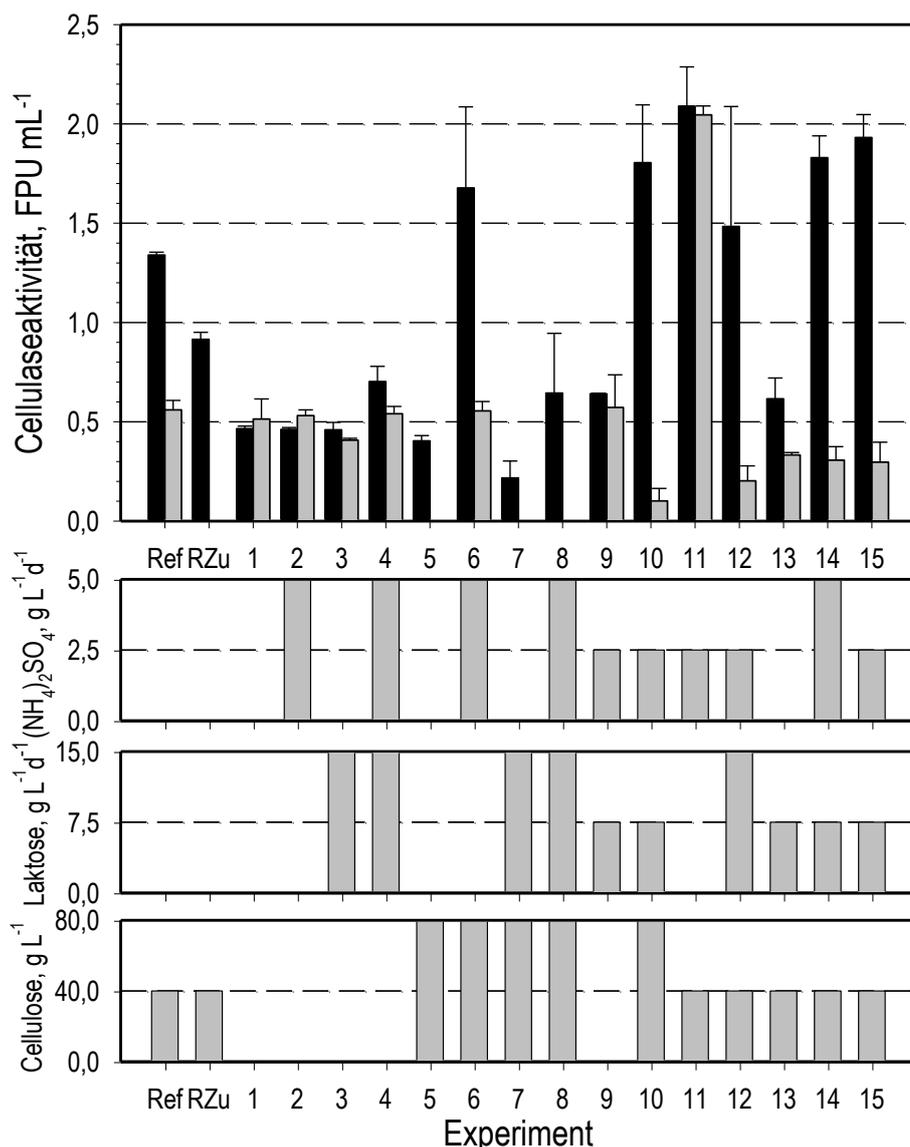
In den Schüttelkolben wiesen die vier Experimente mit den höchsten Proteinkonzentrationen – Experiment 4, 6, 9 und 11 – auch die höchsten CBH1-Aktivitäten auf. Experiment 6 hatte mit  $21,3 \pm 4,6 \text{ nkat mL}^{-1}$  die höchste Aktivität, die wegen der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant höher war, als die Aktivitäten von Experiment 11 mit  $20,1 \pm 1,1 \text{ nkat mL}^{-1}$ . Die Verbindung zwischen Proteinkonzentration und der Aktivität der CBH1 war auch in den Rührkesselreaktoren offensichtlich. Neben Experiment 6 und 11, für die die höchsten Proteinkonzentrationen gemessen wurden, ließen sich für Bedingungen 14 und 15 neben den erhöhten Proteinmengen gegenüber dem Schüttelkolben auch erhöhte Aktivitäten der CBH1 von  $20,9$  und  $20,6 \text{ nkat mL}^{-1}$  ermitteln. Für Experiment 11 wurde mit  $24,8 \pm 1,0 \text{ nkat mL}^{-1}$  die höchsten Aktivitäten bestimmt, die damit 23 % höher als in den Schüttelkolben war. Die mittlere Aktivität für alle Prozessbedingungen der Optimierung war in den Rührkesselreaktoren mit  $9,2 \text{ nkat mL}^{-1}$  fast doppelt so hoch, wie in den Schüttelkolben mit  $5,5 \text{ nkat mL}^{-1}$ .

Auch für die Aktivitäten der  $\beta$ -Glukosidase wurde in den Schüttelkolben für die gleichen experimentellen Ansätze wie bei der CBH1 die höchste Aktivität bestimmt (Abbildung 7.14-B). Jedoch war bei diesem Enzym die Aktivität des experimentellen Betriebspunkt 11 mit  $129,5 \pm 2,2$  nkat mL<sup>-1</sup> am höchsten. In den Rührkesselreaktoren zeigte ebenfalls das Experiment 11 die höchste  $\beta$ -Glukosidaseaktivität mit  $111,5$  nkat mL<sup>-1</sup>, was damit jedoch 14 % unter den Aktivitäten der Schüttelkolben lag. Generell war die mittlere  $\beta$ -Glukosidaseaktivität der 15 Experimente in den Rührkesselreaktoren 16 % niedriger als in den Schüttelkolben.

Die Aktivitäten der Gesamtheit der cellulolytischen Enzyme wurde mit dem Filterpapiertest bestimmt (Abbildung 7.15). In den Schüttelkolben wies nur Experiment 11, welches gegenüber den übrigen Experimenten signifikant höhere Proteinkonzentrationen hatte, eine relevante Aktivität von  $2,05 \pm 0,05$  FPU mL<sup>-1</sup> auf. Dagegen zeigten in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab die Hälfte der experimentellen Bedingungen Aktivitäten größer als  $0,5$  FPU mL<sup>-1</sup>. Unter allen Bedingungen war wiederum für das Experiment 11 mit  $2,09 \pm 0,2$  FPU mL<sup>-1</sup> die höchste Aktivität messbar. Die mittlere Aktivität über die 15 Betriebspunkte lag mit  $1,03$  FPU mL<sup>-1</sup> um 140 % höher als in den Schüttelkolben und das Mittel der relativen Standardabweichung von 16 % war besser als bei den parallelen Satzprozessen (Referenz, vgl. Kapitel 7.1.3).

An den Ergebnissen aus den Rührkesselreaktoren ließ sich erkennen, dass Experimente ohne mikrokristalline Cellulose im Satzmedium (Experiment 1 - 4 und 9) und Experimente, die zwar mikrokristalline Cellulose im Medium hatten, aber kein Ammoniumsulfat im Zulaufmedium (Experiment 5, 7 und 13) niedrige Aktivitäten um  $0,5$  FPU mL<sup>-1</sup> aufwiesen. Eine Ausnahme machte die Bedingung 8, die nur  $0,64 \pm 0,30$  FPU mL<sup>-1</sup> produzierte, obwohl bei dieser bei allen Variablen die Obergrenzen innerhalb der Optimierung zugeführt wurden. Insgesamt konnte mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung in den Schüttelkolbenprozessen ein Medium gefunden werden, das eine höhere Filterpapieraktivität aufwies und – im Verhältnis zur Referenz – trotz einer Volumenerhöhung durch das intermittierende Zulaufverfahren eine Steigerung der volumetrischen Cellulaseaktivitäten um 266 % zeigte. Neben diesem Medium zeigten die übrigen experimentellen Bedingungen jedoch nur geringe Cellulaseaktivitäten, so dass keine Parameteridentifikation des Polynoms 2. Ordnung erfolgen konnte.

Im Gegensatz hierzu konnten für fast alle Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor Cellulaseaktivitäten gemessen werden und die Parameteridentifikation für das Polynom 2. Ordnung (Gleichung 4.5) konnte durchgeführt werden.



**Abbildung 7.15: Cellulaseaktivität von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität gegenüber Filterpapier im Medium der 15 experimentellen Bedingungen zur Optimierung der Cellulaseproduktion, von Satzkultivierungen als Referenz (Ref) und Satzkultivierungen mit Volumenerhöhung (RZu) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (■) und im Schüttelkolben (□) nach 96 h. Für jedes Experiment ist der Mittelwert aus zwei sequenziellen Experimenten dargestellt. Die Ergebnisse der Referenz (Ref) stammen aus 24 parallelen Rührkesselreaktoren, in denen keine Volumenänderung stattfand, wohingegen die Referenz mit Volumenausgleich (RZu) aus drei parallelen Prozessen stammt. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Prozesse betrug immer  $300 \text{ mL L}^{-1}$ . Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufmengen von Laktose und Ammoniumsulfat für die 15 Experimente dargestellt.

### 7.2.1 Schätzung der Enzymaktivitäten

Die experimentellen Ergebnisse im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab zeigten bereits sieben Betriebspunkte, die in Bezug auf die Referenz eine erhöhte Cellulaseproduktion aufwiesen (Abbildung 7.15 und Tabelle 7.1). Die untersuchten Reaktionsbedingungen stellten die Eckpunkte innerhalb des zu untersuchenden Versuchsraums dar.

Tabelle 7.2 stellt die identifizierten Parameter des Polynoms und die zugehörigen statistischen  $p$ -Werte dar. Parameter mit dem Index „1“ geben den Einfluss der Cellulose im Satzmedium, Parameter mit dem Index „2“ geben den Einfluss von Laktose im Zulaufmedium wieder und Ammoniumsulfat wird durch die Parameter mit Index „3“ beschrieben. Bei der Parameteridentifikation wurden nicht signifikante  $\beta$  aus dem Modell solange entfernt, solange  $R^2$  sich verbesserte. Lineare Parameter blieben erhalten, wenn für diese zugehörige Interaktions- oder quadratische Terme existierten. Durch die anschließende erneute Parameteridentifikation und das Lösen der identifizierten Gleichung konnte eine Schätzung von Aktivitäten für den gesamten experimentellen Versuchsraum durchgeführt werden.

**Tabelle 7.1: Cellulase-Produktion mit *Trichoderma reesei* RUT-C30 im Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab: Messergebnisse und geschätzte Cellulaseaktivitäten nach 96 h**

Dargestellt sind die Substratmengen, die in den 15 Experimenten eingesetzt wurden und die experimentell ermittelten, sowie die nach Parameteridentifikation geschätzten Enzymaktivitäten. Dabei wurde die mikrokristalline Cellulose (Avicel PH-101) in den aufgeführten Konzentrationen im Satzmedium vorgelegt. Laktose und Ammoniumsulfat wurden ab 24 h mit einer Abtastzeit von 12 h zudosiert, wobei das zugeführte Gesamtvolumen in die Kultivierungen immer  $300 \text{ mL L}^{-1}$  betrug. Es wurden jeweils drei identische Parallelansätze durchgeführt. Der gesamte Parallelansatz wurde einmal reproduziert. Die Enzymaktivitäten wurden nach einer Prozesszeit von 96 h bestimmt. Ergebnisse mit \* zeigen eine Abweichung „Geschätzt/Experimentell“, die über die 16 % Standardabweichung der Cellulaseaktivität hinausgehen.

Experiment Nummer	Avicel $\text{g L}^{-1}$	Laktose $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Experimentelle Aktivität $\text{FPU mL}^{-1}$	Geschätzte Aktivität $\text{FPU mL}^{-1}$	Quotient Geschätzt/Experimentell
1	0	0,0	0,0	$0,47 \pm 0,01$	0,27	*58 %
2	0	0,0	5,0	$0,46 \pm 0,01$	0,54	116 %
3	0	15,0	0,0	$0,46 \pm 0,04$	0,32	*69 %
4	0	15,0	5,0	$0,70 \pm 0,08$	0,58	*83 %
5	80	0,0	0,0	$0,40 \pm 0,03$	0,67	*166 %
6	80	0,0	5,0	$1,68 \pm 0,41$	1,67	99 %
7	80	15,0	0,0	$0,22 \pm 0,09$	-0,01	*-4 %
8	80	15,0	5,0	$0,64 \pm 0,30$	0,99	*153 %
9	0	7,5	2,5	$0,64 \pm 0,00$	1,03	*160 %
10	80	7,5	2,5	$1,80 \pm 0,29$	1,43	*79 %
11	40	0,0	2,5	$2,09 \pm 0,20$	1,99	95 %
12	40	15,0	2,5	$1,48 \pm 0,60$	1,67	113 %
13	40	7,5	0,0	$0,62 \pm 0,11$	0,91	*148 %
14	40	7,5	5,0	$1,83 \pm 0,11$	1,54	84 %
15	40	7,5	2,5	$1,93 \pm 0,12$	1,83	95 %

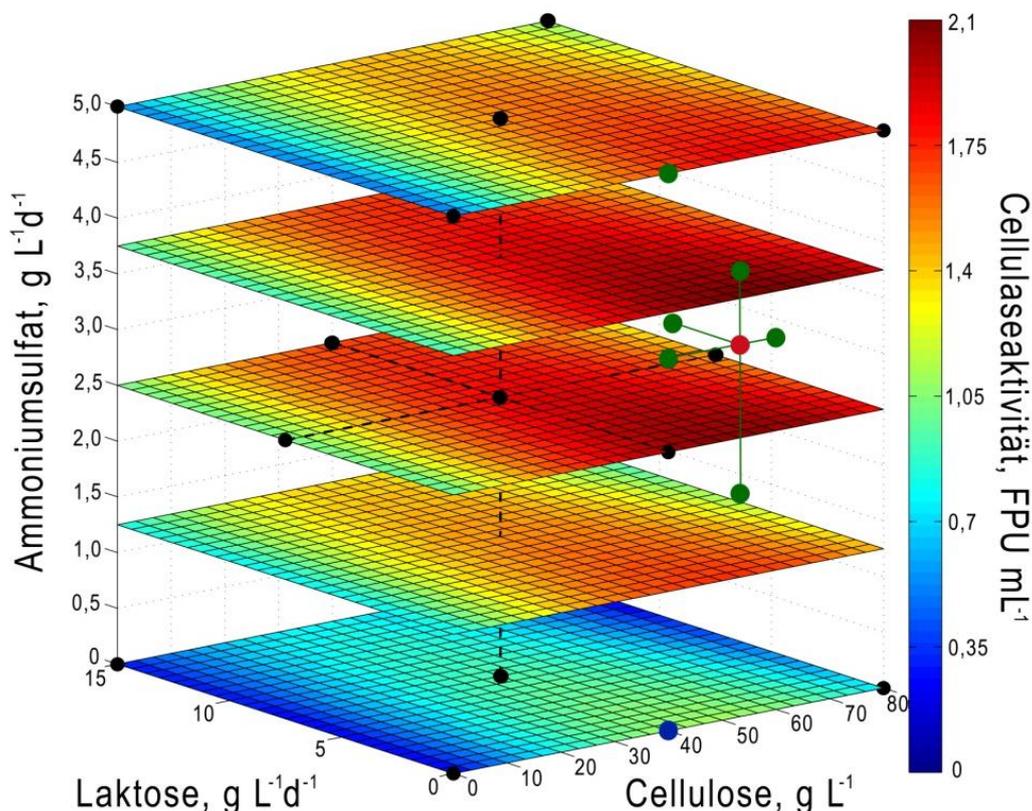
Mit dem identifizierten Polynom 2. Ordnung können die experimentell bestimmten Aktivitäten mit den geschätzten Werten verglichen werden (Tabelle 7.1). Dabei war vor allem für die experimentellen Bedingungen mit Aktivitäten  $> 1,0 \text{ FPU mL}^{-1}$  eine Übereinstimmung von  $> 80 \%$  festzustellen. Das identifizierte empirische Modell zur volumetrischen Cellulaseaktivität ist in Abbildung 7.16 dargestellt. Neben den 15 Betriebspunkten ist der geschätzte optimale Betriebspunkt bei  $53,33 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose,  $0 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  Ammoniumsulfat in Abbildung 7.16 eingezeichnet. Die Cellulaseaktivität wurde

für diesen Punkt mit  $2,1 \text{ FPU mL}^{-1}$  geschätzt und würde damit eine Steigerung der Aktivität um 62 % gegenüber dem Referenzsatzprozess bedeuten.

**Tabelle 7.2: Identifizierte Modellparameter für die Cellulase-Produktion mit *T. reesei* RUT-C30**

Dargestellt sind die ermittelten Parameter  $\beta$  analog Gleichung 4.5 für die Optimierung und deren zugehörigen  $p$ -Werte. Parameter, bei denen das Zeichen „/“ eingetragen sind, wurden als nicht signifikant ausgeschlossen.

Parameter	FPU-Modell	$p$ -Werte der $T$ -Statistik
$\beta_0$	1,8307	$1,59 \cdot 10^{-5}$
$\beta_1$	0,2017	0,1071
$\beta_2$	-0,159	0,1886
$\beta_3$	0,3155	0,0233
$\beta_{12}$	-0,1818	0,18
$\beta_{13}$	0,1826	0,1781
$\beta_{23}$	/	/
$\beta_{11}$	-0,6016	0,0225
$\beta_{22}$	/	/
$\beta_{33}$	-0,6017	0,0224



**Abbildung 7.16: Modellierungsergebnisse der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (Cellulaseaktivität nach 96 h)**

Die volumetrische Cellulaseaktivität (FPU) ist in Abhängigkeit von mikrokristalliner Cellulose im Satzmedium und Laktose und Ammoniumsulfat im Zulaufmedium dargestellt. Die für die Identifikation der Modellparameter verwendeten Betriebspunkte (●), die Satzkultivierung mit Volumenerhöhung (RZu, ●,  $40 \text{ g L}^{-1}$  Avicel,  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumsulfat), die zur Validierung verwendeten Betriebspunkte (●) und der geschätzte optimale Betriebspunkt (●,  $53,33 \text{ g L}^{-1}$  Avicel,  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumsulfat) sind ebenfalls dargestellt. Das zugeführte Gesamtvolumen in die Zulaufexperimente betrug immer  $300 \text{ mL L}^{-1}$ .

Der in Tabelle 7.3 dargestellte Regressionskoeffizient des Modells hatte mit  $R^2 = 0,87$  eine statistische Sicherheit, die im Rahmen der mittleren Standardabweichung der Cellulaseaktivität der 15 Experimente lag. Der korrigierte Regressionskoeffizient, der auch die Anzahl der Variablen einbezieht, lag mit  $R^2_{\text{korr}} = 0,74$  etwas niedriger. Aufgrund der  $F$ -Statistik mit einem Signifikanzniveau von 5 % kann zudem die Nullhypothese durch den  $p$ -Wert von  $\sim 1$  % abgelehnt werden.

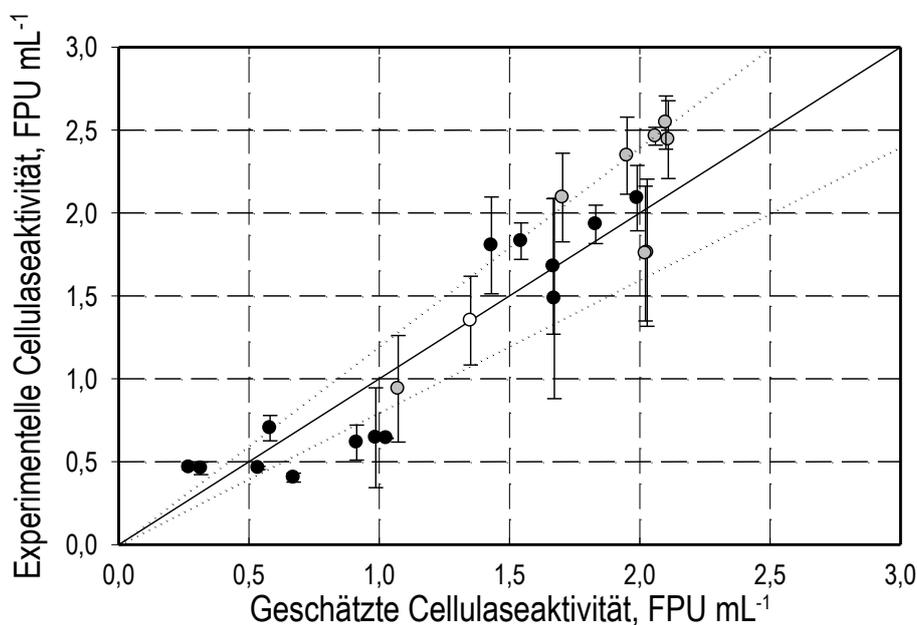
**Tabelle 7.3: Statistische Analyse des identifizierten Modells zur Cellulase-Produktion mit *Trichoderma reesei* RUT-C30 im Zulaufverfahren**

Dargestellt sind der Regressionskoeffizient, der korrigierte Regressionskoeffizient und der  $p$ -Wert für die  $F$ -Statistik.

Koeffizient	FPU-Modell
$R^2$	0,8696
$R^2_{\text{korr}}$	0,7393
$p$ -Wert	0,0114

## 7.2.2 Validierung des identifizierten Modells

Zur Validierung des Modells und des geschätzten Optimums wurden weitere Betriebspunkte um das geschätzte Optimum herum untersucht (Abbildung 7.16, Abbildung 7.17 und Tabelle 7.4).



**Abbildung 7.17: Vergleich von geschätzter und experimenteller Cellulaseaktivität für die Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab**  
Dargestellt sind die experimentell ermittelten und die geschätzten Filterpapieraktivitäten nach 96 h im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab für die Betriebsbedingungen der Optimierung (●), der Validierung (○) und der Referenz (○). Neben der Winkelhalbierenden (—) ist eine relative Abweichung von dieser von  $\pm 20$  % (.....) im Diagramm dargestellt.

Die Reaktionsbedingungen und die geschätzten und experimentell ermittelten Aktivitäten dieser Betriebspunkte sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst. Für alle diese Betriebspunkte wurden die experimentell ermittelten Cellulaseaktivitäten mit weniger als 20 % Abweichung geschätzt (Abbildung 7.17). Der als Optimum geschätzte Betriebspunkt zeigte bei den Validierungsexperimenten nicht die höchste Aktivität. Diese lag zwar mit  $2,44 \pm 0,23$  FPU mL<sup>-1</sup> bei 116 % der geschätzten Aktivität, die höchste Aktivität von  $2,54 \pm 0,16$  FPU mL<sup>-1</sup> konnte aber für den Versuchspunkt 18 ermittelt werden, der mit 60 g L<sup>-1</sup> eine höhere Konzentration an mikrokristalliner Cellulose gegenüber dem geschätzten Optimum hatte. Die Steigerung der Cellulaseaktivität dieses Betriebspunktes gegenüber der Referenz betrug 90 %.

**Tabelle 7.4: Ergebnisse der Validierungsexperimente zur Produktion von Cellulasen mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab**

Dargestellt sind die Substratmengen, die in den Experimenten zur Validierung eingesetzt wurden und die experimentell ermittelten, sowie die nach Parameteridentifikation geschätzten Enzymaktivitäten. Dabei wurde die mikrokristalline Cellulose (Avicel PH-101) in den aufgeführten Konzentrationen im Satzmedium vorgelegt. Laktose und Ammoniumsulfat wurden ab 24 h mit einer Abtastzeit von 12 h zudosiert, wobei das zugeführte Gesamtvolumen in die Kultivierungen immer 300 mL L<sup>-1</sup> betrug. Es wurden jeweils 3 identische Parallelansätze durchgeführt. Die Enzymaktivitäten wurden nach einer Prozesszeit von 96 h bestimmt.

Experiment Nummer	Avicel g L <sup>-1</sup>	Laktose g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Experimentelle Aktivität FPU mL <sup>-1</sup>	Geschätzte Aktivität FPU mL <sup>-1</sup>	Korrelation geschätzt/experimentell
<b>Optm</b>	53,33	0,00	3,33	2,44 ± 0,23	2,11	86%
<b>17</b>	40,00	0,00	3,33	1,76 ± 0,44	2,03	115%
<b>18</b>	60,00	0,00	3,33	2,54 ± 0,16	2,10	83%
<b>19</b>	53,33	0,00	2,00	2,35 ± 0,23	1,95	83%
<b>20</b>	53,33	0,00	4,00	2,46 ± 0,05	2,06	84%
<b>21</b>	53,33	3,00	3,33	1,76 ± 0,41	2,02	115%
<b>11mod</b>	40,00	0,00	5,00	2,09 ± 0,27	1,70	81%
<b>RZu</b>	40,00	0,00	0,00	0,94 ± 0,32	1,07	114%

## Diskussion

Die untersuchten Variablen zeigten in den 15 Experimenten deutliche Unterschiede für die Trockenmasskonzentration, pH und die gemessenen Enzymaktivitäten. Dabei ließ sich insgesamt eine Abnahme der mikrokristallinen Cellulose im Medium beobachten, da die Trockenmasse maximal um den Wert der Startkonzentration der Cellulose lag. Für einen Zellertrag von  $\sim 0,4$  g g<sup>-1</sup><sub>Laktose</sub> wird in den Experimenten eine Biotrockenmasse von mindestens 4 – 17 g L<sup>-1</sup> erwartet (Tholudur et al., 1999). Die gemessenen Biomassewerte lagen jedoch deutlich über diesen, wie Experiment 1 und 2 mit  $\sim 10$  g L<sup>-1</sup> Trockenmasskonzentration bei 10 g L<sup>-1</sup> Laktose zeigten.

Der pH wurde vor allem durch das Ammoniumsulfat im Zulaufmedium beeinflusst. Für experimentelle Bedingungen mit Cellulose im Satzmedium oder Laktosedosierung fand durch das Ammoniumsulfat eine pH-Reduzierung statt. Eine hohe Cellulosekonzentration zeigte

dabei Inhibierungen in den Schüttelkolben, die durch einen höheren pH im Verhältnis zu den Rührkesselreaktoren erkennbar waren. Diese lassen sich wahrscheinlich auf eine schlechtere Sauerstoffversorgung in den Medien zurückführen (vgl. Kapitel 7.1.2).

Die gemessenen Proteinkonzentrationen von  $0,12 - 1,16 \text{ g L}^{-1}$  in den Schüttelkolben und  $0,32 - 1,51 \text{ g L}^{-1}$  in den Rührkesselreaktoren lagen in Konzentrationsbereichen, die ebenfalls in der Literatur beobachtet wurden. Juhász et al. (2005) erreichten bei der Kultivierung von *T. reesei* RUT-C30 im Schüttelkolben mit unterschiedlichen Substraten extrazelluläre Proteinkonzentrationen von  $0,83 - 2,2 \text{ g L}^{-1}$ . Dabei wurde mit „Solka Floc“ als Substrat, das am ehesten mit der mikrokristallinen Cellulose vergleichbar ist, nach 168 h eine Proteinkonzentration von  $0,83 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Ghosh et al. (1984) erreichten mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Avicel im Medium ähnliche Proteinkonzentrationen von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  nach 96 h und nach 216 h ein Maximum von  $1,05 \text{ g L}^{-1}$ .

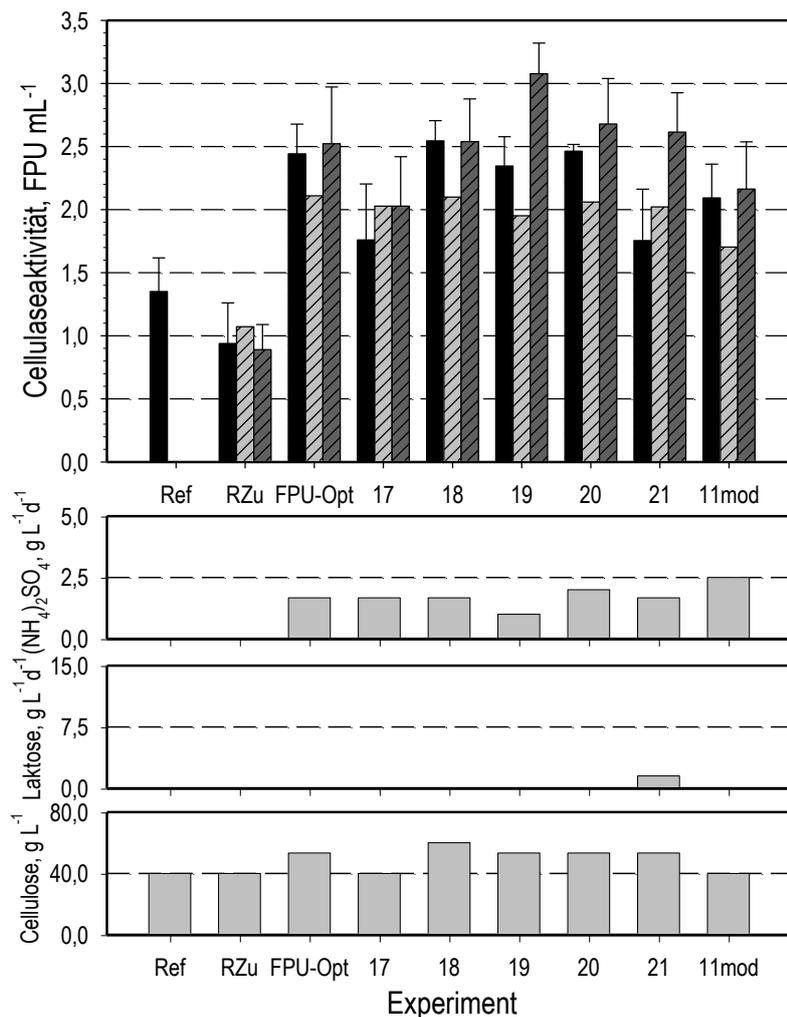
Es zeigte sich bei den Experimenten ein Zusammenhang zwischen den bestimmten Proteinkonzentrationen und den Enzymaktivitäten. Dieser war aufgrund eines Anteils von 60 % CBH1 unter den gesamten sekretierten Cellulasen von *Trichoderma* zu erwarten (vgl. Kapitel 7.1.4). Damit ist die CBH1 das wichtigste Enzym unter den Cellulasen von *Trichoderma* und hat einen starken Einfluss auf die gesamte Cellulaseaktivität. Im Bezug auf die Cellulaseaktivitäten zeigten Esterbauer et al. (1991) in ihrer Zusammenfassung, dass mit verschiedenen *Trichoderma spp.* im Schüttelkolben meistens ebenfalls Aktivitäten bis  $2 \text{ FPU mL}^{-1}$  erreicht wurden. Jedoch wurden in einzelnen Fällen auch  $3,8 \text{ FPU mL}^{-1}$  beschrieben, oder wie von Liming und Xueliang (2004)  $9,38 \text{ IU mL}^{-1}$  nach 360 h, wobei die Autoren bei diesem Prozess auf die Verlängerung der Prozesszeit bei erhöhten Cellulosekonzentrationen hinweisen. Weiterhin erreichten sie für  $40 \text{ g L}^{-1}$  Substrat mit einem C/N-Verhältnis von  $8 \text{ g g}^{-1}$  die höchsten Aktivitäten und stellten weiter fest, dass höhere Verhältnisse die Produktionsgeschwindigkeit verlangsamen. Ryu et al. (1979) zeigten anhand der Kohlenstoff- und Stickstoffaufnahme, dass ein Verhältnis bis  $13 \text{ g g}^{-1}$  ideal für die Cellulaseproduktion war, höhere Verhältnisse die Produktion zwar reduzierten, auf das Wachstum jedoch bis zu einem C/N-Verhältnis von  $15 \text{ g g}^{-1}$  keinen Einfluss zeigten. Experiment 11 wies mit einem C/N-Verhältnis von  $\sim 9 \text{ g g}^{-1}$  – ohne Berücksichtigung des Natrium-Citrat-Puffers – ähnliche Medienzusammensetzungen auf. Die Mediumzusammensetzung des Betriebspunkts 9, welcher im Schüttelkolben die zweit höchste Cellulaseaktivität aufwies, besaß – wie die Referenz – ein C/N-Verhältnis von  $\sim 6 \text{ g g}^{-1}$ . Neben diesem Verhältnis kommt es jedoch auch auf weitere Parameter, wie die Zusammensetzung der Kohlenstoffquellen und die Sauerstoffversorgung im Medium an. Dies ließ sich bei Experiment 6 mit einem C/N-Verhältnis von  $9,8 \text{ g g}^{-1}$  und Experiment 14 mit einem Verhältnis von  $7,9 \text{ g g}^{-1}$  erkennen, die mit guten C/N-Verhältnissen wesentlich schlechtere Aktivitäten im Schüttelkolben als im Rührkesselreaktor erzielten. Hier schien wieder eine zu hohe Feststoffkonzentration oder die zusätzliche Zugabe von Laktose die Cellulaseproduktion in den Schüttelkolben inhibiert zu haben.

Die in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zur Validierung verwendeten Bedingungen stützten noch einmal die Tendenzen, die bei der Erstellung des Modells bereits auffielen. Wie Esterbauer et al. (1991) und Ryu und Mandels (1980) bereits für den Vergleich von Prozessen im Litermaßstab zusammengestellt hatten, konnte auch hier beobachtet werden, dass mit höheren Konzentrationen an mikrokristalliner Cellulose auch höhere Aktivitäten erreicht wurden. Dies war jedoch nur unter der Bedingung der Fall, dass Ammoniumsulfat zudosiert wurde. Durch die intermittierende Zufuhr von Laktose wurde hingegen die Cellulaseproduktion inhibiert, wie bei einem Vergleich der Bedingungen des Optimums mit Experiment 21 zu erkennen war. Auch bei Satzprozessen von Bailey und Tähtiharju (2003) begann die Enzymproduktion erst bei geringen Laktosekonzentrationen. Fand keine Zufuhr von Ammoniumsulfat statt, wie für die Referenzbedingung mit Volumenerhöhung, so ließen sich nur Filterpapieraktivitäten unter  $0,7 \text{ FPU mL}^{-1}$  im Medium bestimmen. Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits von Sternberg (1976) gemacht, der durch die Erhöhung der Cellulosekonzentration und der Stickstoffzufuhr durch eine pH-Regelung mit Ammoniumhydroxyd eine Steigerung in der Cellulaseaktivität erreichte.

Eine weitere Komponente mit Einfluss auf die Produktivität der Cellulasen konnte, wie bereits beschrieben in dem Sauerstofftransfer ins Medium gefunden werden. In der Validierung konnte, neben der bekannten negativen Einflüssen einer Sauerstofflimitierung, auch ein Einfluss der Gaszusammensetzung der Zuluft auf die Cellulaseproduktion beobachtet werden: Durch eine Verringerung des reinen Sauerstoffs in der Zuluft konnte mit den in der Validierung untersuchten Betriebsbedingungen (Tabelle 7.4) eine weitere Steigerung der Cellulaseproduktion erreicht werden (Abbildung 7.18). Unter Bedingungen mit verringerter Sauerstoffzufuhr, aber weiterhin ohne Sauerstofflimitierung, wurde eine maximale Cellulaseaktivität von  $3,08 \pm 0,24 \text{ FPU mL}^{-1}$  für Experiment 19 bestimmt. Weiterhin wurde durch die verringerte Sauerstoffzufuhr eine Steigerung der mittleren Aktivität der sieben Betriebspunkte um 14 %, also  $2,52 \text{ FPU mL}^{-1}$  gegenüber den Bedingungen mit der ursprünglich verwendeten Sauerstoffzufuhr gemessen. Im Gegensatz zu den zur Validierung des Modells untersuchten Betriebspunkten konnte für die Referenzbedingung mit Zulauf keine Steigerung durch die Reduktion des Sauerstoffgehalts in der Zuluft beobachtet werden.

Der Einfluss von hohen Sauerstoffkonzentrationen auf die Proteinproduktion mit Pilzen ist ansonsten in der Literatur bisher nur unzureichend untersucht. Zum Beispiel berichtete Bai et al. (2003), dass die Anreicherung der Gasphase mit reinem Sauerstoff bei *Aspergillus niger* durch die Verwendung des alternativen respiratorischen Stoffwechselwegs zu einer Reduktion in der intrazellulären und heterologen Proteinproduktion führte. Wang et al. (2005) fasst zusammen, dass zu diesem Thema unterschiedliche Ergebnisse gefunden wurden und keine verallgemeinerbare Aussage gemacht werden kann, wohingegen bei Li et al. (2009) der Einfluss von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen auf eine Reduzierung der Oberfläche durch die Verkürzung der Hyphen und Erhöhung des Cytoplasmas von *Aspergillus* als allgemein akzeptiert beschrieben wird.

In den Optimierungen in Schüttelkolben und Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab konnten deutliche Unterschiede in den Ergebnissen beobachtet werden. In beiden Optimierungen zeigte zwar Experiment 11 die höchste Aktivität, der weitere Erkenntnisgewinn durch eine Parameteridentifikation des Polynoms 2. Ordnung war jedoch nur für die Rührkesselreaktoren möglich. Dabei zeigten die Schüttelkolben eine deutliche Limitierung gegenüber Medien mit hohem Feststoffgehalt oder Substratkonzentration. Eine Optimierung solcher Medien ist daher nur in den Rührkesselreaktoren jedoch nicht in den Schüttelkolben durchführbar, da die Ergebnisse aus den Schüttelkolben bei der Übertragung in den Rührkesselreaktor falsche Interpretationen zulassen könnten.



**Abbildung 7.18: Vergleich der Betriebsbedingungen mit variierenden Sauerstoffkonzentrationen in der Zuluft**

Cellulaseaktivitäten (FPU) nach 96 h Kultivierung von experimentellen Bedingungen, die für die Validierung des Modells zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit *T. reesei* RUT-C30 genutzt wurden. Medien und Prozessbedingungen der beiden Kultivierungen waren identisch. Der Unterschied lag in einem Sauerstoffprofil, wie es während der Optimierung verwendet wurde (■, Gesamtsauerstoff in der Zuluft: 0-12,5) und einer reduzierten Sauerstoffkonzentration in der Zuluft (▣, Gesamtsauerstoff in der Zuluft: 0-10). Neben diesen sind die geschätzten Aktivitäten dargestellt (▨). Die dargestellten Ergebnisse setzen sich aus Experimenten in jeweils 3 parallelen Rührkesselreaktoren zusammen. Eine Ausnahme macht die Referenz ohne Volumenerhöhung (Ref) bei der das Mittel aus 15 parallelen Reaktoren abgebildet wurde. Neben den Ergebnissen ist die Cellulosekonzentration im Satzmedium und Zulaufraten von Laktose und Ammoniumsulfat für die Experimente dargestellt.

### 7.3 Reaktionstechnische Untersuchungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Nach der Optimierung der Cellulaseproduktion im Millilitermaßstab wurden einige Betriebspunkte im Litermaßstab weiter charakterisiert. Dies waren sowohl die Referenzbedingung und der optimale Betriebspunkt als auch die experimentellen Bedingungen 15 und 11 als bester Betriebspunkt während der Optimierung.

In Kapitel 7.1.4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Cellulaseaktivität von Satzverfahren im Rührkesselreaktor zwischen den beiden Maßstäben vergleichbar war. Nun wurden die drei zusätzlichen Betriebsbedingungen im Litermaßstab kultiviert, über den gesamten Prozessverlauf weiterführend charakterisiert und anschließend mit dem Millilitermaßstab verglichen, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen den Maßstäben zu untersuchen.

Die in den Prozessen im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab verwendeten Kennwerte mit einem volumetrischen Leistungseintrags von  $2,8 \text{ W L}^{-1}$  mit einem  $k_L a$  von  $0,049 \text{ s}^{-1}$  in Wasser und im Litermaßstab von  $1,3 - 10,7 \text{ W L}^{-1}$  mit einem  $k_L a$  von bis zu über  $0,2 \text{ s}^{-1}$  waren nicht vergleichbar. Die maximale lokale Energiedissipation von  $17 \text{ W kg}^{-1}$  im Millilitermaßstab und bis zu  $205 \text{ W kg}^{-1}$  im Litermaßstab wies einen Unterschied von Faktor 10 auf. Die hohen Leistungseinträge im Litermaßstab waren nötig, um während der Prozesse eine minimale Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase von  $> 20 \%$  Luftsättigung zu gewährleisten. Dies konnte im Millilitermaßstab durch die Anreicherung der Zuluft mit reinem Sauerstoff gewährleistet werden (Tabelle 7.5).

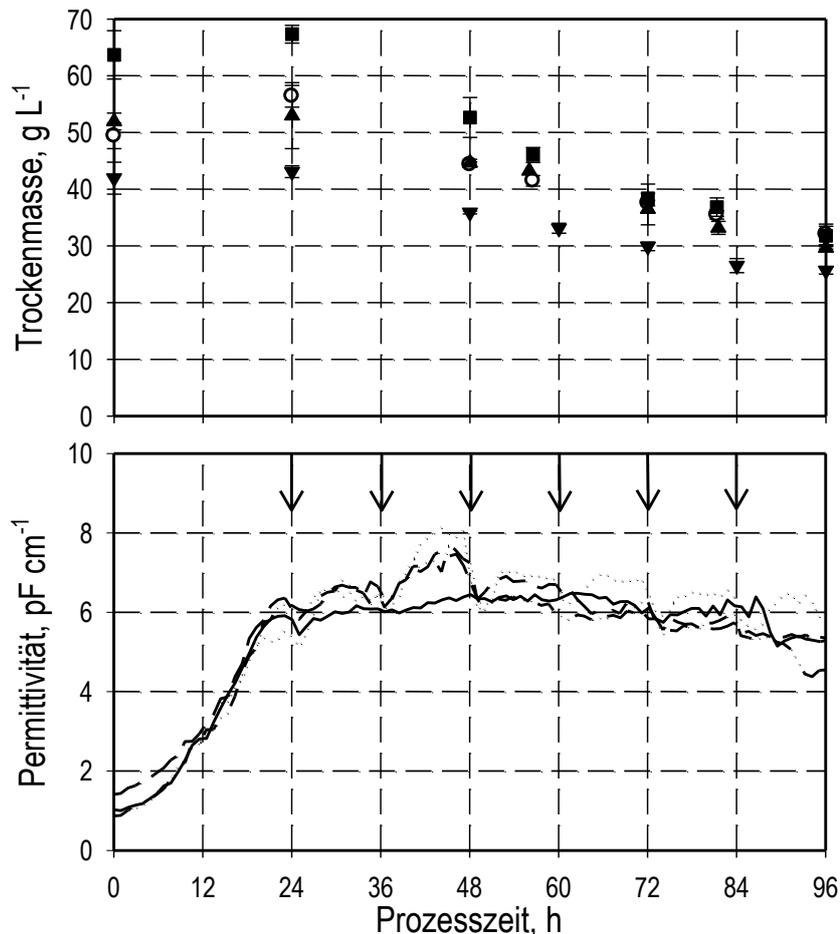
**Tabelle 7.5: Prozessparameter für Produktionsprozesse mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor**

Parameter	Millilitermaßstab	Litermaßstab
Rührerdrehzahl	$1200 \text{ min}^{-1}$	$500 - 1000 \text{ min}^{-1}$
Volumetrischer Leistungseintrag	$2,83 \text{ W L}^{-1}$	$1,33-10,63 \text{ W L}^{-1}$
Maximale Energiedissipation	$17,0 \text{ W kg}^{-1}$	$25,7 - 205,5 \text{ W kg}^{-1}$
$k_L a$	$0,049 \text{ s}^{-1}$	$\sim 0,25 \text{ s}^{-1}$
Begasungsrate	$1 \text{ L min}^{-1}$	$0,25 - 1,5 \text{ vvm}$
	(in alle Reaktoren)	
$p_{\text{O}_2}$ -Bereich	$> 20\%$	$> 20\%$
Sicherstellung der $\text{O}_2$ -Versorgung	Anreicherung der Zuluft mit $\text{O}_2$ $0,0 - 0,4 \text{ L min}^{-1}$	Rührerdrehzahl und Begasungsrate
Zugabe von Zulaufmedium	Intermittierend (Abtastzeit 12 h)	Intermittierend (Abtastzeit 12 h)

Für die vier im Litermaßstab untersuchten Betriebspunkte wurden die Trockenmassekonzentrationen bestimmt (Abbildung 7.19). Nach der Inokulation wurden, bis auf die Prozesse von Experiment 15, Trockenmassekonzentrationen bestimmt, die  $\sim 10 \text{ g L}^{-1}$  über den Konzentrationen der eingesetzten Cellulose lagen. In den ersten 24 h der Satzphase wurde die im Satzmedium vorhandene Laktose verbraucht, wobei nur geringe und nicht signifikante Zunahmen der Trockenmasse bestimmt wurden. Im weiteren Verlauf nahm die

Trockenmassekonzentration ab, sodass für alle Prozesse nach 96 h Trockenmassekonzentrationen von  $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$  gemessen wurden.

Durch die Verwendung einer Biomassesonde beruhend auf dem Messprinzip der Kapazität konnte die Lebendbiomassekonzentration im Prozess online geschätzt werden. Die gemessene Kapazität war in Vorversuchen mit volllöslichem Glukosemedium mit der gemessenen Biotrockenmassekonzentration linear korreliert worden, wobei ein Korrelationsfaktor von 1,69 bestimmt wurde (Daten nicht dargestellt).



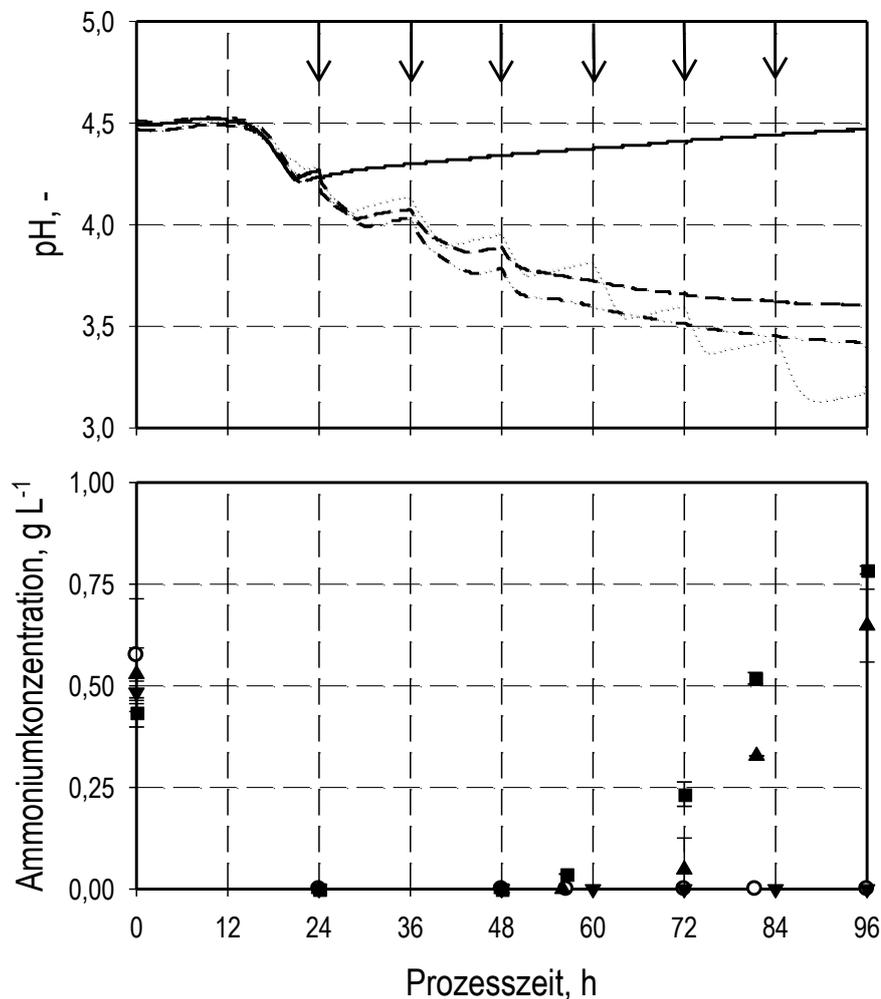
**Abbildung 7.19: Trockenmassekonzentration und Lebendbiomassekonzentration in Zulaufverfahren mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

Dargestellt ist die Trockenmassekonzentration (A) und die online gemessene Lebendbiomassekonzentration als Permittivität (B) für Kultivierungen der Referenz (○, —), der experimentellen Bedingungen 11 (▲, ---) und 15 (▼, ···) und des Optimums (■, -·-·) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Litermaßstab. Die dargestellte Trockenmassekonzentration stellt den Mittelwert aus zwei sequenziellen Kultivierungen dar. Die online bestimmte Lebendbiomassekonzentration wurde als Permittivität in einem Zulaufprozess gemessen und die Daten mit einer Funktion geglättet (vgl Kapitel 4.3.1.3).

Während den ersten 24 h waren alle vier Prozesse in Bezug auf die Lebendbiomassekonzentration miteinander vergleichbar. Dabei konnte zwischen 7 und 17 h ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von  $\sim 0,1 \text{ h}^{-1}$  ermittelt werden. Nach 24 h hatten alle Cellulaseproduktionsprozesse eine mit  $\sim 6 \text{ pF cm}^{-1}$  korrelierende Lebendbiomassekonzentration in dem Medium. Für die Referenzprozesse blieb diese Lebendbiomassekonzentration bis 84 h im Medium messbar und sank anschließend bis zum

Prozessende auf  $5,3 \text{ pF cm}^{-1}$ . Die übrigen drei Betriebspunkte zeigten bis 45 h eine weitere Zunahme der Lebendbiomassekonzentration auf  $7,5 - 8,0 \text{ pF cm}^{-1}$ . Dabei war eine erneute Zunahme der Lebendbiomassekonzentration nach der Zugabe des Zulaufmediums bei 36 h zu beobachten, wobei für den Betriebspunkt 15 mit  $8,0 \text{ pF cm}^{-1}$  die höchste Lebendbiomassekonzentration erreicht wurde. Im weiteren Verlauf der Prozesse ließ sich eine generell abnehmende Lebendbiomasse beobachten, die nach der Zugabe des Zulaufmediums jeweils für einige Stunden wieder anstieg. Zu Prozessende wurde für Experiment 15 mit  $5,8 \text{ pF cm}^{-1}$  die höchste Lebendbiomassekonzentration gemessen.

Ergänzend zur Biomassekonzentration ließen sich an den Änderungen im pH die Einflüsse der Zuläufe auf den Metabolismus erkennen. Die Verläufe des pH und die Ammoniumkonzentrationen in den Medien der vier unterschiedlichen Betriebspunkte sind in Abbildung 7.20 dargestellt.



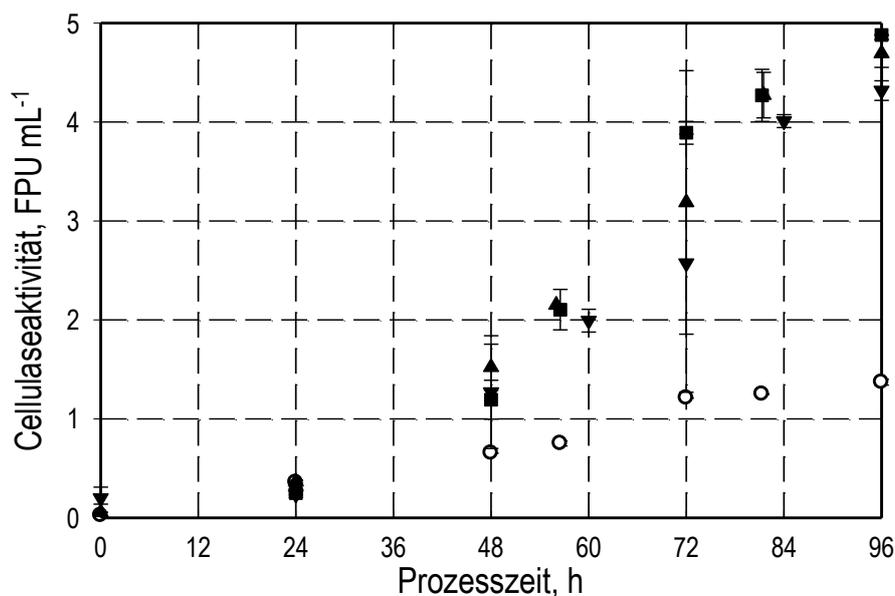
**Abbildung 7.20: Ammoniumkonzentrationen und pH in Zulaufverfahren mit *T. reesei* RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab**

Dargestellt sind der pH (A) und die Ammoniumkonzentrationen im Überstand (B) des Referenzprozesses (○, —), der experimentellen Bedingungen 11 (▲, - - -) und 15 (▼, ···) und des Optimums (■, - · - ·) mit *T. reesei* RUT-C30 im Litermaßstab. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus zwei sequenziellen Zulaufverfahren dar, wobei für den pH aus Gründen der Übersichtlichkeit die Standardabweichung nicht dargestellt ist.

Der pH zeigte für alle Bedingungen während der Satzphase den gleichen Abfall von pH 4,5 auf pH ~ 4,25 bis 22 h, mit einem anschließenden Anstieg bis 24 h. Ab der ersten Zugabe des Zulaufs bei 24 h war der pH nicht mehr zwischen den Prozessen vergleichbar. Bei den Referenzbedingungen stieg der pH nach 24 h weiterhin an, bis – wie in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab – nach 96 h wieder pH ~ 4,5 gemessen wurde. Für die Medien mit Zulauf ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Zulaufdosierung und einem anschließenden Abfall des pH erkennen. Für die experimentelle Bedingung 15, welche Laktose und Ammoniumsulfat im Zulaufmedium hatte, folgte nach jeder Zugabe des Zulaufmediums für ungefähr 3 - 4 h ein Abfall um pH ~ 0,25 bis wiederum ein Anstieg um pH ~ 0,06 bis zur nächsten Zugabe stattfand. Hierdurch sank der pH in Stufen bis zum Prozessende auf einen pH 3,2 und war damit niedriger, als im Millilitermaßstab, in dem pH 3,5 gemessen wurden. Für die experimentellen Bedingungen mit ausschließlich Ammoniumsulfat im Zulaufmedium, also Experiment 11 und das geschätzte Optimum, war nur während der ersten 3 Zugaben, von 24 - 48 h, eine starke Abnahme des pH zu beobachten. Beim Vergleich der beiden Bedingungen ließ sich erkennen, dass der Abfall für die Bedingungen des Optimums jeweils länger andauerte und der pH dadurch stärker sank. Diese Beobachtung lässt sich auf die höhere Ammoniumsulfatkonzentration im Zulauf zurückführen. Nach einem anfänglich starken Abfall nach der dritten Zugabe bei 48 h fand bis zum Ende der Prozesse ein gleichmäßiger schwächerer Abfall des pH statt. Am Prozessende wurden so pH 3,6 für Betriebspunkt 11 und pH 3,4 für das geschätzte Optimum ermittelt.

Die Ammoniumkonzentration zu Beginn der Prozesse lag bei ~ 0,5 g L<sup>-1</sup>. In keinem der Prozesse ließ sich nach 24 h noch Ammonium im Medium nachweisen. Für die Prozesse mit dem optimalen Betriebspunkt wurde ein erneuter Anstieg der Ammoniumkonzentration im Medium nach 48 h gemessen. Die Ammoniumkonzentration nahm für diese Prozesse linear bis auf 0,78 g L<sup>-1</sup> am Prozessende zu. Ebenso konnte für die experimentelle Bedingung 11 nach 60 h ein Anstieg an Ammonium bis auf 0,65 g L<sup>-1</sup> nach 96 h im Medium beobachtet werden.

Der Vergleich der Filterpapieraktivitäten für die Prozesse im Litermaßstab zeigte für die ersten 24 h kaum cellulolytische Aktivitäten für die vier Bedingungen (Abbildung 7.21). Im weiteren Verlauf der Prozesse war ein signifikanter Unterschied zwischen den Referenzbedingungen und den weiteren Betriebspunkten zu erkennen. Für die Referenzbedingungen wurde eine kontinuierliche Zunahme der Cellulaseaktivität während des Prozesses auf  $1,37 \pm 0,03$  FPU mL<sup>-1</sup> nach 96 h gemessen. Die Zulaufprozesse zeigten ab 24 h eine stärkere Zunahme der Aktivitäten im Medium, die bis 48 h mit  $1,19 - 1,52$  FPU mL<sup>-1</sup> für alle drei vergleichbar war. Bis zum Prozessende hatte jedoch die experimentelle Bedingung 15, die als einzige Laktose im Zulauf hatte, eine geringere Zunahme und mit  $4,32 \pm 0,1$  FPU mL<sup>-1</sup> signifikant niedrigere Aktivitäten als die Prozesse mit Zulaufmedien ohne Laktose im Zulauf mit  $4,69 \pm 0,14$  FPU mL<sup>-1</sup> (Experiment 11) und  $4,88 \pm 0,003$  FPU mL<sup>-1</sup> (Optimum).



**Abbildung 7.21: Cellulaseaktivitäten in Zulaufverfahren mit *T. reesei* RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität (FPU) im Überstand für des Referenzprozesses (○), der experimentellen Bedingungen 11 (▲) und 15 (▼) und des berechneten Optimums (■) mit *T. reesei* RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab. Die Cellulaseaktivitäten wurden jeweils für zwei sequenzielle Zulaufprozesse bestimmt und gemittelt.

### Diskussion

Unter allen Prozessbedingungen ließ sich während der Satzphase ein vergleichbares Wachstum beobachten, bis die Laktose bei ~24 h verbraucht war. Anschließend kam es je nach Zulaufmedium zu einem erneuten Wachstum. Die in den Prozessen gemessene Trockenmassekonzentration nahm hingegen ab 24 h kontinuierlich ab, was auf einen Verbrauch der mikrokristallinen Cellulose im Medium hinwies. Dieses zweiphasige Wachstum, das hier durch die Verwendung von Laktose und Cellulose in den Prozessen auftrat, wurde auch von Marten et al. (1996) für *T. reesei* RUT-C30 für die Verwendung von Hefeextrakt und Cellulose beobachtet. Zudem konnten die Autoren auch den Abfall der Zellmassekonzentration am Ende ihrer Prozesse beobachten, der umso früher begann, je höher die Leistungseinträge in den Rührkessel waren.

Die Abnahme des pH in den Medien war auf die Ammoniumsulfatzugabe zurückzuführen. Während des Verbrauchs wurde das Sulfation freigesetzt und der pH änderte sich ins saure Milieu. Für die Bedingungen 11 und das Optimum konnte eine kontinuierliche Abnahme des pH gemessen werden, sobald sich das Ammonium im Medium angereichert hatte und kontinuierlich verbraucht wurde. Der Anstieg der Ammoniumkonzentration am Ende der Prozesse könnte zum einen auf einen Verbrauch der mikrokristallinen Cellulose im Reaktor und eine dadurch reduzierte metabolische Aktivität der Kulturen hinweisen. Hierfür würde auch der starke Abfall in dem online gemessenen Biomassesignal und der gleichzeitig nur noch leichte Rückgang in der Trockenmasse sprechen (Abbildung 7.19). Zum anderen könnte dies an einer Freisetzung von Ammonium durch einen Abbau der intrazellulären Proteine aus den Pilzen liegen, die bereits von Sternberg (1979) für ältere Kulturen beschrieben wurde.

Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da dann auch in den anderen beiden Prozessbedingungen ein Ammoniumanstieg zu erwarten gewesen wäre. Der sofortige Verbrauch des Ammoniums nach der Zugabe deutet auf eine Stickstofflimitierung im Medium hin. Durch eine gleichmäßigere Zufuhr des Ammoniums wäre wahrscheinlich eine konstantere metabolische Aktivität der Zellen möglich. Weiterhin wäre bei der Vorlage von Feststoffen im Satzmedium eine Kontrolle des Wachstums über die Zufuhr an Stickstoff möglich. Dies würde die komplizierte Zuführung von Feststoffen erübrigen, ohne auf die Wachstumskontrolle eines Zulaufprozesses verzichten zu müssen. Auch die Cellulaseproduktion im Referenzprozess scheint bei der hier verwendeten Prozessführung eindeutig auf eine Stickstofflimitierung hinzuweisen. Mukataka et al. (1988) kultivierten einen vergleichbaren Stamm mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  Avicel als Substrat bei pH 5, ebenfalls ohne die Zugabe von weiterem Stickstoff während des Prozesses. Dabei wurden trotz einer pH-Regelung nur maximal  $1.2 \text{ IU mL}^{-1}$  nach 7 Tagen erreicht, was auch in diesen Prozessen auf eine Stickstofflimitation schließen ließ und mit den hier dargestellten Referenzprozessen vergleichbar war.

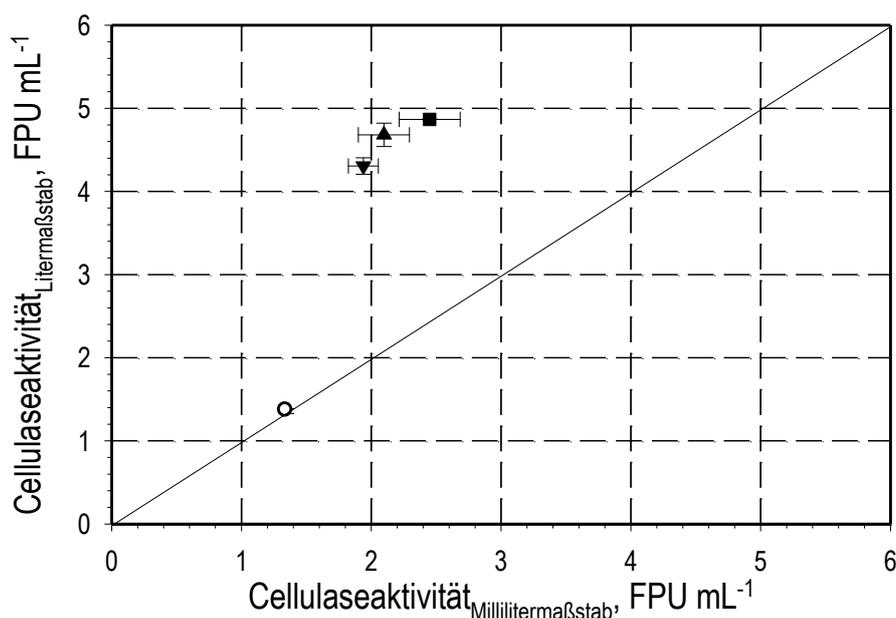
Die schlechtere Cellulaseproduktion von Experiment 15 gegenüber den Prozessen mit den anderen beiden Zulaufmedien kann nicht auf den niedrigeren pH nach 96 h zurückgeführt werden, da dieser für die Kultivierung der Bedingung 15 erst nach 72 h unter den pH des optimalen Betriebspunkts sank. Zum Prozessende lag der pH der experimentellen Bedingung 15 zwar am niedrigsten, war jedoch weiterhin in einem Bereich von pH 3 bis pH 4, welcher von vielen Autoren als der ideale Produktionsbereich für Cellulasen mit *T. reesei* beschrieben wurde (Ryu und Mandels, 1980; Esterbauer et al., 1991). Stattdessen wird die intermittierende Zufuhr der Laktose und die hierdurch entstehenden nicht limitierenden Bedingungen zu einer Inhibition der Cellulaseproduktion geführt haben, wie bereits in Kapitel 7.2.2 diskutiert wurde. Auch für den Referenzprozess ließ sich die geringere Enzymproduktion vor allem auf den fehlenden Stickstoff und nicht auf den höheren pH zurückführen.

Tangnu et al. (1981) erreichte mit dem hier verwendeten Stamm, mit geänderten Ammoniumsulfatkonzentrationen und kontrolliertem pH für  $25 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose (Solka Flok)  $5,2 \text{ U mL}^{-1}$  und für  $50 \text{ g L}^{-1}$  Cellulose  $14,4 \text{ U mL}^{-1}$  nach einer längeren Prozesszeit von 8 Tagen. Nach 4 Tagen waren die Cellulaseaktivitäten gegenüber Filterpapier mit den  $4,5 - 5 \text{ FPU mL}^{-1}$  aus den hier dargestellten Prozessen vergleichbar. Sternberg und Doval (1979) beschrieben für *T. reesei* QM9414, einen etwas schlechteren Cellulaseproduzenten, unter nicht limitierenden Ammoniumkonzentrationen einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen der Cellulaseaktivität und der Cellulosekonzentration im Bereich von 2 – 8 % Cellulose im Medium. Dabei erreichten sie Aktivitäten von  $3,5 \text{ U mL}^{-1}$  für 4 % und  $\sim 4,5 \text{ U mL}^{-1}$  für 8 % Cellulose nach 5 beziehungsweise 6 Tagen.

Die durchgeführten Prozesse zeigten also Ergebnisse, die ohne pH-Regelung und mit intermittierendem Zulauf mit Literaturergebnissen vergleichbar waren.

Die klassische Maßstabsübertragung erfolgt anhand von Kennwerten, wie dem volumetrischen Leistungseintrag  $P \cdot V^{-1}$  oder dem  $k_{La}$  (Marques et al, 2010; Pessoa et al, 1996). Diese Kriterien wurden hier aufgrund der Unterschiede in der Begasung und der

Geometrie der Rührorgane nicht angewendet. Als Kriterium wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium von  $> 20\%$  Luftsättigung gewählt, wodurch unterschiedliche Prozessparameter in den Rührkesseln vorlagen. Trotz der unterschiedlichen Prozessparameter ließ sich die Referenzbedingung ohne Zulauf zwischen den Maßstäben übertragen (vgl. Kapitel 7.1.4). Dies könnte auf die für diesen Betriebspunkt gefundene Stickstofflimitierung zurückzuführen sein, die die Unterschiede in den Prozessparametern wahrscheinlich überlagerte. Für die übrigen Prozesse mit Zulauf wurden hingegen im Litermaßstab doppelt so hohe Aktivitäten wie im Millilitermaßstab bestimmt (Abbildung 7.22).



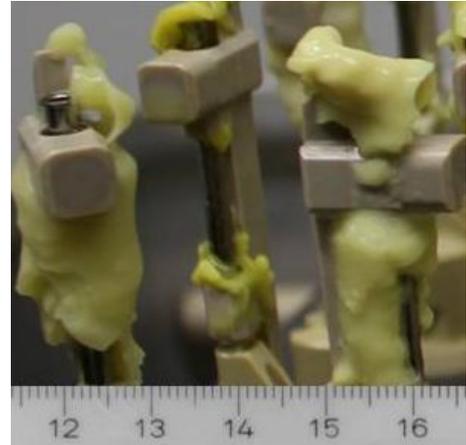
**Abbildung 7.22: Vergleich von Cellulaseaktivitäten von *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor in Milliliter- und Litermaßstab**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität (FPU) nach 96 h des Referenzprozesses (○), der experimentellen Bedingungen 11 (▲) und 15 (▼) und des berechneten Optimums (■) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab. Die dargestellten Ergebnisse im Millilitermaßstab zu den experimentellen Bedingungen (11 und 15) stellen den Mittelwert aus zwei sequenziellen Kultivierungen mit jeweils drei parallelen Rührkesselreaktoren dar. Die Referenz stellte den Mittelwert aus einer Kultivierung mit 24 und einer mit 15 parallelen Rührkesselreaktoren dar. Das Optimum wurde in drei parallelen Rührkesseln bestimmt. Die Filterpapieraktivitäten im Litermaßstab wurden jeweils in zwei unabhängigen Prozessen im Rührkesselreaktor bestimmt und gemittelt.

Neben den Inhibierungen, die durch die hohen Sauerstoffkonzentrationen in den Medien im Millilitermaßstab verursacht wurden (vgl. Kapitel 7.2.2), führte auch die Volumenzunahme in den Reaktoren zu Unterschieden der Substratkonzentrationen. Im Millilitermaßstab wurde auf eine Probeentnahme aus den Rührkesselreaktoren verzichtet und das verdunstete Wasser durch die Zufuhr von VE-Wasser ausgeglichen. Hierdurch ergab sich eine Volumenzunahme von  $1,3 V_{\text{Ende}} V_{\text{Start}}^{-1}$  in den Reaktoren. Im Litermaßstab wurde durch die regelmäßigen Probeentnahmen und den fehlenden Verdunstungsausgleich nur eine Volumenzunahme von  $1,1 V_{\text{Ende}} V_{\text{Start}}^{-1}$  beobachtet. Neben dem Volumeneffekt änderte sich dabei das Verhältnis von Zulauf- und Reaktionsvolumen. Dieser Volumeneffekt kann weitere Einflüsse auf den

Prozess gehabt haben, da das Verhältnis des Reaktionsvolumens zum Zulaufvolumen sich hierdurch in beiden Maßstäben unterschiedlich verhielt.

Ein weiterer Unterschied lag in der Verteilung der Biomasse im Reaktor. Im Millilitermaßstab befanden sich ~ 40 % der Trockenmasse aus Zellen und Cellulose am Rührorgan immobilisiert. Der Durchmesser eines solchen Immobilats betrug bis zu ~ 1 cm, so dass die Diffusionswege bis zu 0,5 cm sein konnten (Abbildung 7.23). Die Zellen im Inneren des Immobilisierten könnten hierdurch also einer Stofflimitierung ausgesetzt gewesen sein. In Riboflavinproduktionsprozessen wurde durch die Reduzierung der Biomasse keine Änderung in der Produktivität festgestellt (Vester, 2009b). In den Cellulaseproduktionsprozessen war hingegen nicht nur die Zellkonzentration im Medium erniedrigt, sondern durch die immobilisierte Cellulose auch die Substratkonzentration. Die Verringerung der Substratverfügbarkeit in den Prozessen kann also höchstwahrscheinlich zu einer Änderung der Cellulaseproduktion geführt haben.



**Abbildung 7.23: Immobilisierte Biomasse an Rührorganen im Millilitermaßstab**

Die Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab waren also für die Optimierung des Mediums nutzbar und reduzierten die Experimente im Litermaßstab. Die Unterschiede der gewählten Prozessbedingungen und der frei vorliegenden Zellkonzentration verhinderten jedoch eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Prozessen in Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab.

#### 7.4 Zusammenfassung

Es wurde ein Vergleich zwischen Zulaufprozessen im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab für die Produktion von Cellulasen mit *T. reesei* RUT-C30 durchgeführt. Sowohl im Schüttelkolben, als auch in den Rührkesselreaktoren wurden jeweils 15 Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt, sequentiell wiederholt und die Filterpapieraktivität nach 96 h als Maßstab für die Cellulaseproduktion bestimmt. Variiert wurden die Cellulosekonzentration im Satzmedium, die Ammonium- und die Laktosemenge im Zulaufmedium. In den Schüttelkolben konnte nur bei einer der untersuchten Reaktionsbedingungen eine relevante Cellulaseaktivität gemessen werden. Die durchgeführten Zulaufverfahren im Millilitermaßstab zeigten unterschiedliche Enzymaktivitäten nach 96 h. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten die Parameter des empirischen Modells (Polynom 2. Ordnung) zur Beschreibung der Cellulaseaktivität nach 96 h als Funktion dieser Variablen identifiziert werden. Das Optimum wurde bei  $53,33 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalline Cellulose (Avicel PH-101),  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Ammoniumsulfat bestimmt und konnte validiert werden. Damit konnte eine Steigerung der Cellulaseaktivität im Zulaufverfahren um 182 % gegenüber der Satzkultivierung erreicht werden.

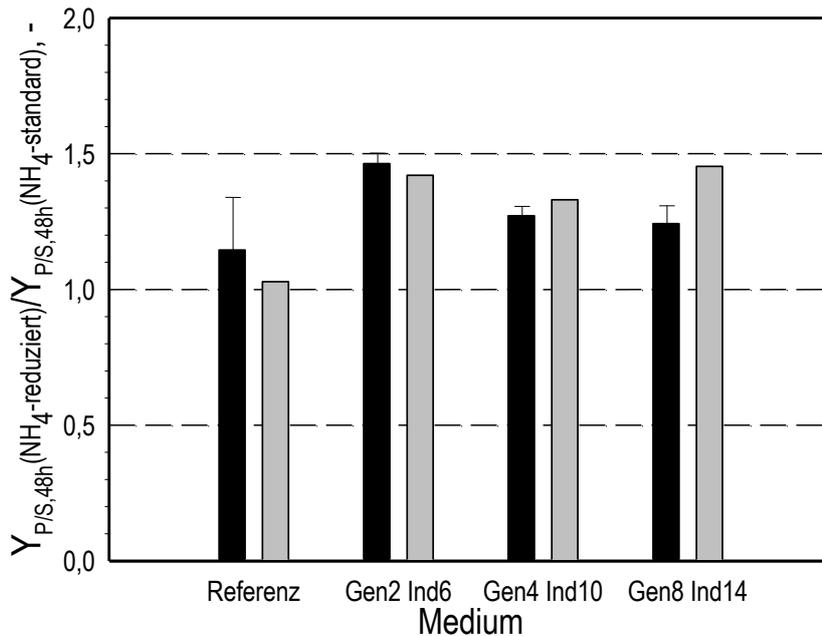
Sowohl der Satzprozess, als auch drei weiteren Betriebspunkte wurden im Rührkesselreaktor im Litermaßstab näher betrachtet. Dabei wurde der Einfluss der Zulaufmedien auf den pH-Verlauf, die Ammoniumkonzentration im Medium und die Cellulaseaktivität weiter untersucht. Das Satzverfahren in den Rührkesselreaktoren war zwischen dem Milliliter- und Litermaßstab in der Cellulaseproduktion direkt vergleichbar. Die Zulaufprozesse zeigten im Litermaßstab nach 96 h um den Faktor  $\sim 2$  erhöhte Cellulaseaktivitäten. Hier lag die Steigerung der Aktivität zwischen Satzprozess und dem geschätzten Optimum bei 356 %. Die Unterschiede zwischen den Maßstäben lagen dabei wahrscheinlich an einer hohen Immobilisierung der Biomasse in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab, die Stofflimitierungen und eine verringerte Produktivität zur Folge haben können.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

### 8.1 Zusammenfassung

Zulaufverfahren stellen in der biotechnologischen Produktion eine häufig verwendete Prozessführung dar. Im Gegensatz zu den einfacheren Satzverfahren lassen sich durch die Zugabe von Substraten während des Prozesses Substratinhibierungen und die Bildung unerwünschter Nebenprodukte umgehen. Zudem lassen sich optimale Wachstumsraten für die Produktbildung einstellen. Die Entwicklung und Optimierung dieser Verfahren ist langwierig, da sie nur in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab durchgeführt werden können, wodurch die Parallelisierung begrenzt ist. Durch die Verwendung von Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab kann die Parallelisierung erhöht und der zeitliche und personelle Aufwand der Prozessentwicklung reduziert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Verwendung von parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab für die Entwicklung und Optimierung von Zulaufmedien zu untersuchen. Hierzu wurden zum einen reaktionstechnische Untersuchungen zur Stickstoffdosierung für die Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* durchgeführt. Zum anderen wurde die Paralleltechnik für die Entwicklung und Optimierung von Zulaufverfahren für filamentöse Pilze im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab genutzt. Durch Untersuchungen der Zulaufprozesse im Litermaßstab sollten weitere Informationen über die Prozesse gewonnen werden.

Für Riboflavinproduktionsprozesse mit *B. subtilis* wurden vier unterschiedliche Satzmedien auf ihre Stickstoffversorgung im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab analysiert. Bei den Riboflavinproduktionsprozessen mit intermittierendem Zulauf wurde eine Anreicherung des Ammoniums im Medium durch die verwendete Stickstoffdosierung ermittelt. Eine Reduzierung der Stickstoffdosierung verringerte die Ammoniumkonzentration nach 24 h und 48 h im Medium. Durch diese Reduzierung verbesserte sich auch die integrale Riboflavinausbeute für die untersuchten Satzmedien. Die Riboflavinproduktionsprozesse wurden mit den Stickstoffdosierungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab mit kontinuierlichem Zulauf weiter auf die Inhibierung durch Ammonium untersucht. Bei kontinuierlichem Zulauf konnten zwar die Ammoniumkonzentrationen der intermittierenden Dosierung im Millilitermaßstab reproduziert werden, die integralen Riboflavinausbeuten waren jedoch unterschiedlich. Die relativen Änderungen der integralen Riboflavinausbeuten waren wiederum unabhängig von der Art der Dosierung (intermittierend im Millilitermaßstab und kontinuierlich im Litermaßstab, Abbildung 8.1).



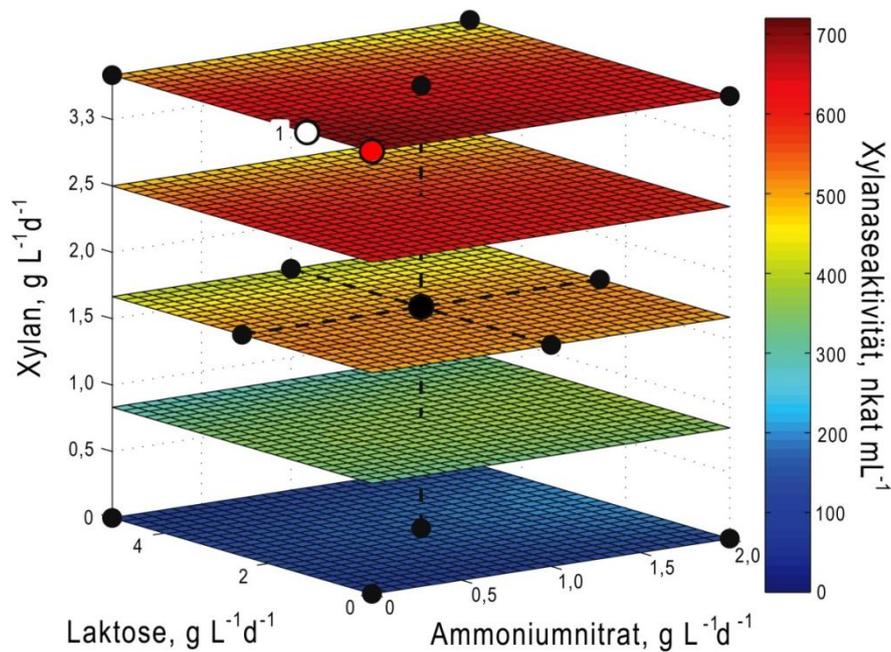
**Abbildung 8.1: Steigerung der integralen Riboflavinausbeuten nach 48 h im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab**

Dargestellt sind die Veränderungen der integralen Riboflavinausbeuten ( $Y_{P/S}(\text{reduziert})/Y_{P/S}(\text{standard})$ ) nach 48 h für Milliliter- (■) und Litermaßstab (■) bei Verwendung unterschiedlicher Zulaufmedien.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus aculeatus* DSM 2344 in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab untersucht. Es zeigten sich Standardabweichungen in der Xylanaseproduktion, die mit Prozessen im Schüttelkolben vergleichbar waren, obwohl das Wandwachstum in den Rührkesselreaktoren höher war.

Mit Hilfe eines empirischen Modells (Polynom 2. Ordnung) wurden die Einflüsse von Xylan, Laktose und Ammoniumnitrat im Zulaufmedium auf die Xylanase- und  $\beta$ -Xylosidaseproduktion mit *A. aculeatus* nach 96 h untersucht und mit Bedingungen eines Satzverfahrens verglichen. Durch eine intermittierende Zufuhr von Xylan konnte eine Steigerung der Xylanaseproduktion um den Faktor 4 auf  $715 \pm 52 \text{ nkat mL}^{-1}$  erreicht und validiert werden (Abbildung 8.2). Für die  $\beta$ -Xylosidase wurde eine maximale Aktivität von  $5,76 \text{ nkat mL}^{-1}$  nach 96 h Prozesszeit mit Hilfe des identifizierten Polynoms 2. Ordnung geschätzt und validiert.

Durch die Übertragung von drei Zulaufprozessen in den Rührkesselreaktor im Litermaßstab konnte die Produktion auf maximal  $1621 \text{ nkat mL}^{-1}$  Xylanase- und  $15,7 \text{ nkat mL}^{-1}$   $\beta$ -Xylosidaseaktivität weiter gesteigert werden. Die höchste Xylanaseaktivität wurde in beiden Maßstäben für den gleichen Betriebspunkt bestimmt (Zugabe von  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Xylan ohne Ammoniumnitrat und Laktose im Zulaufmedium).



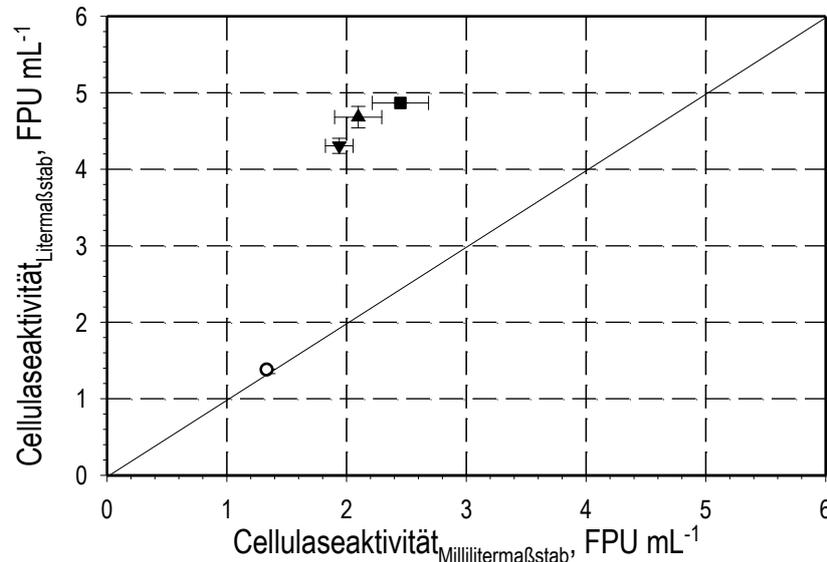
**Abbildung 8.2: Graphische Darstellung des identifizierten Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von *A. aculeatus* DSM 2344**

Dargestellt ist die volumetrische Xylanaseaktivität für die drei Variablen Ammoniumnitrat-, Laktose- und Xylandosierung für Kultivierungen mit *A. aculeatus* DSM2344 nach 96 h. Der validierte Betriebspunkt (O; Zugabe von  $0,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumnitrat,  $1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Xylan) und der bestimmte optimale Betriebspunkt (●) sind in der Graphik markiert. Das zugeführte Gesamtvolumen des Zulaufs in die Kultivierungen betrug immer  $210 \text{ mL L}^{-1}$ .

Als drittes Beispiel für die reaktionstechnische Untersuchung von Zulaufprozessen wurde ein Vergleich zwischen Zulaufprozessen im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab für die Produktion von Cellulasen mit *T. reesei* RUT-C30 durchgeführt. Sowohl im Schüttelkolben, als auch in den Rührkesselreaktoren wurden jeweils 15 Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt, sequentiell wiederholt und die Filterpapieraktivität nach 96 h als Maßstab für die Cellulaseproduktion bestimmt. Variiert wurden die Cellulosekonzentration im Satzmedium und die Ammonium- und die Laktosemenge im Zulaufmedium. In den Schüttelkolben konnte nur bei einer der untersuchten Reaktionsbedingungen eine relevante Cellulaseaktivität gemessen werden. Die durchgeführten Zulaufverfahren im Millilitermaßstab zeigten unterschiedliche Enzymaktivitäten nach 96 h. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten die Parameter des empirischen Modells (Polynom 2. Ordnung) zur Beschreibung der Cellulaseaktivität nach 96 h als Funktion dieser Variablen identifiziert werden. Das Optimum wurde bei  $53,33 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalline Cellulose (Avicel PH-101),  $0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Laktose und  $3,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Ammoniumsulfat bestimmt und validiert. Damit konnte eine Steigerung der Cellulaseaktivität im Zulaufverfahren um 182 % gegenüber der Satzkultivierung erreicht werden.

Sowohl der Satzprozess, als auch drei weitere Betriebspunkte wurden im Rührkesselreaktor im Litermaßstab näher betrachtet. Dabei wurde der Einfluss der Zulaufmedien auf den pH-Verlauf, die Ammoniumkonzentration im Medium und die Cellulaseaktivität weiter untersucht. Das Satzverfahren in den Rührkesselreaktoren war zwischen dem Milliliter- und

Litermaßstab in der Cellulaseproduktion direkt vergleichbar. Die Zulaufprozesse zeigten im Litermaßstab nach 96 h eine um den Faktor  $\sim 2$  erhöhte Cellulaseaktivität (Abbildung 8.3). Hier lag die Steigerung der Aktivität zwischen Satzprozess und dem geschätzten Optimum bei 356 %. Die Unterschiede zwischen den Maßstäben lagen dabei wahrscheinlich an einer hohen Immobilisierung der Biomasse in den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab, die Stofflimitierungen und eine verringerte Produktivität zur Folge haben können.



**Abbildung 8.3: Vergleich von Cellulaseaktivitäten von *T. reesei* im Rührkesselreaktor in Milliliter- und Litermaßstab**

Dargestellt ist die Cellulaseaktivität (FPU) im Überstand für die Prozesse der Referenz (○), der experimentellen Bedingungen 11 (▲) und 15 (▼) und des berechneten Optimums (■) mit *T. reesei* RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab. Die dargestellten Ergebnisse im Millilitermaßstab zu den experimentellen Bedingungen der Optimierung (11 und 15) stellen den Mittelwert aus zwei sequenziellen Kultivierungen mit jeweils drei parallelen Rührkesselreaktoren dar. Die Referenz stellte den Mittelwert aus einer Kultivierung mit 24 und einer mit 15 parallelen Rührkesselreaktoren dar. Das Optimum wurde in drei parallelen Rührkesseln bestimmt. Die Filterpapieraktivitäten im Litermaßstab wurden jeweils in zwei unabhängigen Prozessen im Rührkesselreaktor bestimmt und gemittelt.

Im Falle der Riboflavinproduktion wurde hier eine eindimensionale Suchmethode verwendet, bei der immer nur eine Prozessgröße im Zulaufmedium geändert wurde – anders bei den Optimierungen mit den filamentösen Pilzen, bei denen ein quadratischer Polynomansatz genutzt wurde. Hier mussten zur Optimierung der drei untersuchten Variablen jeweils 15 Experimente durchgeführt werden, um die Parameter des Polynoms 2. Ordnung zu identifizieren. Mit beiden Methoden konnten Steigerungen der gewünschten Zielgrößen, Ausbeute beziehungsweise Aktivität für Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab erreicht werden. Die direkte Übertragbarkeit der Prozessergebnisse zwischen den Rührkesselreaktoren im Milliliter- und Litermaßstab war nur für das Satzverfahren zur Produktion von Cellulasen möglich. Bei allen drei Optimierungen gab es jedoch einen Bezug zwischen den Maßstäben, durch den die im Millilitermaßstab gewonnenen Ergebnisse qualitativ für den Litermaßstab nutzbar waren. Auf diese Weise ließen sich komplexe Zusammenhänge vieler Medienbestandteile in statistischen

Versuchsplanungen in kurzer Zeit durchführen, da in den 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab 16 Betriebspunkte im Dreifachansatz auf einmal untersucht werden können. Im Rührkesselreaktor im Litermaßstab hängt die hierfür benötigte Zeit von der verfügbaren Anzahl an Bioreaktoren ab.

## 8.2 Ausblick

Es wurden Betriebspunkte in Rührkesselreaktoren sowohl im Millilitermaßstab als auch im Litermaßstab reaktionstechnisch untersucht. Zur Übertragung der absoluten Prozessergebnisse müssten weitere Verbesserungen in der Prozessführung erfolgen, sodass die Kriterien zur Maßstabsübertragung verwendet werden können. Beispielsweise wurde bei zwei der Prozesse die Zuluft mit reinem Sauerstoff angereichert, was negative Effekte auf die Biomasse bzw. die Produktion von Cellulasen hatte. Hierfür wäre es bei zukünftigen Optimierungen sinnvoll, die Substratkonzentrationen in allen Versuchsansätzen so konstant zu halten, dass der Anteil des Sauerstoffs in der Zuluft erniedrigt werden kann. Eine Implementierung zur Steuerung der Sauerstoffzugabe in die Zuluft in die Prozesssoftware wäre daher sinnvoll. Dies würde eine Überversorgung oder Unterversorgung in den Prozessen verringern und könnte den  $pO_2$  auf physiologisch sinnvolle Konzentrationen ( $pO_2 \leq 100\%$ ) regeln. Weiterhin konnte in keinem der Prozesse im Millilitermaßstab der pH online gemessen werden, da entweder das Produkt (Riboflavin) mit den Sensoren interagiert oder der verwendete pH-Bereich nicht durch die Sensoren unterstützt wurde. Hier muss in Zukunft die Stabilität und die Verwendbarkeit der Sensoren erweitert werden, um eine Kontrolle möglich zu machen. Dadurch wäre für die Produktion von Xylanasen und Cellulasen eine Prozessoptimierung mit konstantem pH und wahrscheinlich eine Steigerung der Produktivität möglich.

Eine automatisierte Probeentnahme aus den Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab durch einen Laborroboter ist sinnvoll für at-line Untersuchungen der Prozesse. Dabei müssen die Pippetiernadeln des Roboters von oben durch die Abluftöffnungen der Rührkesselreaktoren in das Reaktionsmedium fahren. Bei der Nutzung des gasinduzierenden Rührers, kann die Nadel an dem Rührorgan vorbei in das Medium fahren und die Probe entnehmen. Der Paddelrührer kann aufgrund seiner Geometrie jedoch direkt unter den Öffnungen stehen, so dass es zu einer Kollision zwischen Nadel und Rührer kommen kann. Ein definiertes magnetisches Feld könnte den Rührer so ausrichten, dass eine Kollision ausgeschlossen ist. Die Implementierung eines solchen Modus für eine automatisierte Probeentnahme wäre daher sinnvoll.

In Kultivierungen mit *A. aculeatus* DSM 2344 konnte neben dem Myzelwachstum auch ein Wachstum in Form von Pellets realisiert werden. Die Pelletgröße schien dabei nicht von dem volumetrischen Leistungseintrag des Rührers sondern von der Anzahl der Pellets und dem Spaltmaß zwischen Rührer und Wand abzuhängen. Die Entstehung und Kultivierung von Pellets wurde bis dato noch für keinen Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab beschrieben. Es wäre in jedem Fall interessant, diese Zusammenhänge in den parallelen Rührkesselreaktoren weiter zu untersuchen.

## 9 Literaturverzeichnis

- Aehle W. 2004. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Altenbach-Rehm J, Nell C, Arnold M, Weuster-Botz D. 1999. Parallel Bubble Columns with Fed-Batch Technique for Microbial Process Development on a Small Scale. *Chem. Eng. Technol* 22(12):1051–1058. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4125\(199912\)22:12<1051:AID-CEAT1051>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4125(199912)22:12<1051:AID-CEAT1051>3.0.CO;2-C).
- Aro N, Pakula T, Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29(4):719–739. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>.
- Bacher A, Eberhardt S, Fischer M, Kis K, Richter G. 2000. Biosynthesis of Vitamin B2 (Riboflavin). *Annual Review of Nutrition* 20(1):153–167.
- Bai Z, Harvey LM, White S, McNeil B. 2004. Effects of oxidative stress on production of heterologous and native protein, and culture morphology in batch and chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D). *Enzyme Microb. Technol.* 34(1):10–21.
- Bailey MJ, Tähtiharju J. 2003. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62(2):156–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1276-9>.
- Bailey MJ, Linko M. 1990. Production of [beta]-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *Journal of Biotechnology* 16(1-2):57–66. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816569090065J>.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23(3):257–270. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3C-47GJBFV-JC/2/a44e3b36c2cd37d0a7b49adb7b0d776f>.
- Bareither R, Pollard D. 2011. A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: Current state and future need. *Biotechnol Progress* 27(1):2–14. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.522>.
- BASF. 01.08.2011. Pressemeldung: BASF and CSM explore a bio-based succinic acid joint venture. <http://www.basf.com/group/pressrelease/P-11-373>
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3):326–338. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530100704>.
- Berber R, Pertev C, Türker M. 1999. Optimization of feeding profile for baker's yeast production by dynamic programming. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 20(3):263–269. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00009047>.
- Bigelis R. 1989. Industrial products of biotechnology: application of gene technology. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*. Vol 7b. VCH, Weinheim: 243
- Blachnik C, Vreden N. 2007. *Lebensmittelführer: Inhalte, Zusätze, Rückstände*: WILEY-VCH.

- Boch J, Kempf B, Bremer E. 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol* 176(17):5364–5371.
- Bošković JD, Narendra KS. 1995. Comparison of linear, nonlinear and neural-network-based adaptive controllers for a class of fed-batch fermentation processes. *Automatica* 31(6):817–840. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000510989400139A>.
- Box GEP, Wilson KB. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13(1):1–45.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248–254.
- Bretzel W, Schurter W, Ludwig B, Kupfer E, Doswald S, Pfister M, van Loon APGM. 1999. Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22(1):19–26. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900604>.
- Cao Y, Meng D, Lu J, Long J. 2008. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 7(5):631–638.
- Cabrera AC, Poznyak AP, Poznyak TP, Aranda JA. 2002. Identification of a fed-batch fermentation process: comparison of computational and laboratory experiments. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24(5):319–327. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-001-0273-6>.
- Carvalho J, Vitolo M, Sato S, Aquarone E. 2003. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 110(3):151–164. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:110:3:151>.
- Chan LCL, Greenfield PF, Reid S. 1998. Optimising fed-batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system. *Biotechnol. Bioeng* 59(2):178–188. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980720\)59:2<178:AID-BIT6>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980720)59:2<178:AID-BIT6>3.0.CO;2-E).
- Chaudhuri B, Modak JM. 1998. Optimization of fed-batch bioreactor using neural network model. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 19(1):71–79. <http://dx.doi.org/10.1007/s004490050485>.
- Chen LZ, Nguang SK, Chen XD. 2002. On-line identification and optimization of feed rate profiles for high productivity fed-batch culture of hybridoma cells using genetic algorithms. *ISA Transactions* 41(4):409–419. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0019057807600986>.
- Chipeta Z, Du Preez J, Christopher L. 2008. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(6):587–594. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0320-2>.
- Chmiel H (Hrsg.). 2006. *Bioprozesstechnik*. Elsevier GmbH. München.
- Christgau S, Kauppinen S, Vind J, Kofod LV, Dalbøge H. 1994. Expression cloning, purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem Mol Biol Int* 33:917–925.
- Christgau S, Sandal T, Kofod LV, Dalbøge H. 1995. Expression cloning, purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Current Genetics* 27(2):135–141. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00313427>.

- de Tremblay M, Perrier M, Chavarie C, Archambault J. 1992. Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 7(5):229–234. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00369551>.
- de Vries, R.de Vries. 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(1):10–20. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1171-9>.
- Deindorfer, F. H. and Gaden, E. L. (1955). Effects of liquid physical properties on oxygen transfer in penicillin fermentation. *Appl. Microbiol.*, 3, 253–257.
- Detsch C, Stülke J. 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* 149(11):3289–3297.
- Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JMS, Fonseca LP. 2001. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. *Biotechnol. Lett.* 23(10):771–775.
- Doran PM. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Science & Technology Books. Oxford.
- Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour. Technol.* 36(1):51–65. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V24-4903N0W-BB/2/e003fc9404a8e465b34ba17ae2dd3308>.
- Etschmann MMW, Sell D, Schrader J. 2004. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. *Proceedings of the 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations - BIOTRANS'03. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29(1-6):187–193. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117704000566>.
- Fantes PA, Roberts CF. 1973. {beta}-Galactosidase Activity and Lactose Utilization in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 77(2):471–486
- Frahm B, Pörtner R, Lane P, Munack A. 2005. Optimierung und Steuerung von Zellkultur-Fed-Batch-Prozessen mittels einer Kollokationsmethode. *Chemie Ingenieur Technik* 77(4):429–435. <http://dx.doi.org/10.1002/cite.200407094>.
- Fujimoto H, Ooi T, Wang S-, Takizawa T, Hidaka H, Murao S, Arai M. 1995. Purification and Properties of Three Xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59(3):538–540. [http://www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnlabstract\\_en.php?cdjournal=bbb1992&cdvol=59&noissue=3&startpage=541](http://www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnlabstract_en.php?cdjournal=bbb1992&cdvol=59&noissue=3&startpage=541).
- Gebhard G. 2010. Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur Bernsteinsäureherstellung. Dissertation. TU München
- Gerlach SR, Siedenberg D, Gerlach D, Schügerl K, Giuseppin MLF, Hunik J. 1998. Influence of reactor systems on the morphology of *Aspergillus awamori*. Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology. *Process Biochemistry* 33(6):601–615. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959298000168>.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* Vol. 59(2):257–268.
- Gnoth S, Jenzsch M, Simutis R, Lübbert A. 2008. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(1):21–39. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-007-0163-7>.
- Grewal HS, Kalra KL. 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnol. Adv.* 13(2):209–234. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4X-3Y452B7-170/2/ccdeca99157effbf6bf0fcaa43cec4c9>.

- Havel J, Link H, Hofinger M, Franco-Lara E, Weuster-Botz D. 2006. Comparison of genetic algorithms for experimental multi-objective optimization on the example of medium design for cyanobacteria. *Biotechnology Journal* 1(5):549–555.
- Heefner, Donald L., Weaver, Craig A., Yarus, Michael J., Burdzinski, Linda A., Gyure, Dale C., Foster, Edward W. 1994. Riboflavin Producing strains of microorganisms, method for celectring, and method for fermentation.
- Henzler H, Schäfer EE. 1987. Viskose und elastische Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chemie Ingenieur Technik* 59(12):940–944.  
<http://dx.doi.org/10.1002/cite.330591209>.
- Henzler H. 2007. Auslegung von Rührfermentern – Berücksichtigung der nicht-Newton'schen Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chemie Ingenieur Technik* 79(7):951–965.  
<http://dx.doi.org/10.1002/cite.200600112>.
- Höfel T, Wittmann E, Reinecke L, Weuster-Botz D. 2010. Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(2):477–484.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2739-4>.
- Hortsch R, Stratmann A, Weuster-Botz D. 2010a. New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 106(3):443–451. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22706>.
- Hortsch R, Weuster-Botz D. 2010b. Milliliter-Scale Stirred Tank Reactors for the Cultivation of Microorganisms. In: Allen I. Laskin SSaGMG, editor. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press. p 61–82.
- Hortsch R, Weuster-Botz D. 2010c. Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnol Progress* 26(2):595–599.  
<http://dx.doi.org/10.1002/btpr.338>.
- Hortsch R, Krispin H, Weuster-Botz D. 2011a. Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34(3):297–304. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-010-0471-1>.
- Hortsch R. 2011b.- Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Dissertation. TU München.
- Hümbelin M, Griesser V, Keller T, Schurter W, Haiker M, Hohmann H, Ritz H, Richter G, Bacher A, van Loon APGM. 1999. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22(1):1–7. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900590>.
- Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson K, Brown S, Meagher MM. 1999. Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 24(7):438–445.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022998001616>.
- Jürgen B, Tobisch S, Wumpelmann M, Gordes D, Koch A, Thurow K, Albrecht D, Hecker M, Schweder T. 2005. Global expression profiling of *Bacillus subtilis* cells during industrial-close fed-batch fermentations with different nitrogen sources. *Biotechnol Bioeng* 92(3):277–298.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16178035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16178035).

- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem.* 40(11):3519–3525.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4GDK9XP-2/2/8ff1ee8e6015ca53e1aa36fbdbeb9bd5>.
- Kadowaki M, Souza C, Simão R, Peralta R. 1997. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 66(2):97–106.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02788755>.
- Kalman RE. 1960. A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems. *Transactions of the ASME--Journal of Basic Engineering*(82):35–46.
- Karelov D, Kreneva R, Errais Lopes L, Perumov D, Mironov A. 2011. Mutational analysis of the ribC gene of *Bacillus subtilis*. *Russian Journal of Genetics* 47(6):757–761.  
<http://dx.doi.org/10.1134/S102279541106010X>.
- Kennedy M, Krouse D. 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23(6):456–475.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900755>.
- Kim SW, Kang SW, Lee JS. 1997. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology* 59(1):63–67.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852496001277>.
- Kleist S, Miksch G, Hitzmann B, Arndt M, Friehs K, Flaschel E. 2003. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(5):456–462. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1229-3>.
- Knob A, Terrasan C, Carmona E. 2010.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(3):389–407.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>.
- Knorr B. 2005. Scale-down and parallel operation of a riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. Dissertation. TU München
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann H, Weuster-Botz D. 2007. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal* 33(3):263–274.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X06003433>.
- Kofod L, Kauppinen M, Christgau S, Heldt-Hansen H, et al. 1997. Enzymes with xylanase activity from *Aspergillus aculeatus*. Novo Nordisk A/S, US-Patent Nr. 5693518
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *Fems Microbiol. Rev.* 23(4):411–456. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>.
- Larsen B, Rask Poulsen B, Eriksen NT, Lønsmann Iversen JJ. 2004. Homogeneous batch cultures of *Aspergillus oryzae* by elimination of wall growth in the Variomixing bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(2):192–198.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1437-x>.
- Leejeerajumnean A, Ames JM, Owens JD. 2000. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett Appl Microbiol* 30(5):385–389.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10792668](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10792668).
- Lemos J, Fontes M, Pereira N. 2001. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93(1):681–689. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:681>.

- Li Y, Liu Z, Cui F, Xu Y, Zhao H, Liu Z. 2007. Application of Statistical Experimental Design to Optimize Culture Requirements of *Aspergillus sp.* Zh-26 Producing Xylanase for Degradation of Arabinoxylans in Mashing. *Journal of Food Science* 72(5):E320-E329. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00389.x>.
- Li Q, Harvey LM, McNeil B. 2009. Oxidative stress in industrial fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 29(3):199–213.
- Liming X, Xueliang S. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresour. Technol.* 91(3):259–262. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V24-49D6Y21-3/2/11895c98efac05cb1bb053982f33acbf>.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265–275. <http://www.jbc.org/content/193/1/265.short>.
- Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE, Davison B, Hamilton R, Himmel M, Keller M, McMillan JD, Sheehan J, Wyman CE. 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotech* 26(2):169–172. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0208-169>.
- Mandels M, Weber J. 1969. The production of cellulases. *J. Adv. Chem. Ser.* 95(23):391–414.
- Marques MPC, Cabral JMS, Fernandes P. 2010. Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 85(9):1184–1198. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2387>.
- Marteijn RCL, Jurrius O, Dhont J, Gooijer CD de, Tramper J, Martens DE. 2003. Optimization of a feed medium for fed-batch culture of insect cells using a genetic algorithm. *Biotechnol. Bioeng.* 81(3):269–278. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10465>.
- Marten MR, Velkovska S, Khan SA, Ollis DF. 1996. Rheological, Mass Transfer, and Mixing Characterization of Cellulase-Producing *Trichoderma reesei* Suspensions. *Biotechnol Progress* 12(5):602–611. <http://dx.doi.org/10.1021/bp950066b>.
- Marti K, Gröger D. 2000. Einführung in die lineare und nichtlineare Optimierung: Physica-Verlag, Heidelberg.
- Martínez I, Bennett GN, San K. 2010. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metabolic Engineering* 12(6):499–509. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717610000844>.
- Merino S, Cherry J. 2007. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In: Olsson L, editor. *Biofuels*: Springer Berlin / Heidelberg. p 95–120.
- Meyer H, Werbitzky O. 2011. How green can the Industry become with biotechnology? ,in *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*: John Wiley & Sons, New Jersey: 23-44.
- Michaelis L, Menten ML. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z* 49(333-369).
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426–428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 1(2):127–132. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326976090004X>.
- Min B, Park Y, Kang S, Song Y, Lee J, Park C, Kim C, Kim S. 2007. Statistical optimization of medium components for the production of xylanase by *Aspergillus niger* KK2 in submerged cultivation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12(3):302–307. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02931108>.
- Möseneder J: *Römpp Online - Version 3.15*, 2011, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol* 3:371-378.

- Montgomery D. 2008. Design and analysis of experiments: John Wiley and Sons, New Jersey.
- Mukataka S, Kobayashi N, Sato S, Takahashi J. 1988. Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng* 32(6):760–763. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260320606>.
- Mukhopadhyay SN, Malik RK. 1980. Increased production of cellulase of *Trichoderma sp.* by pH cycling and temperature profiling. *Biotechnol. Bioeng* 22(11):2237–2250. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260221104>.
- Na JN, Chang YC, Chung BC, Lim HL. 2002. Adaptive optimization of fed-batch culture of yeast by using genetic algorithms. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24(5):299–308. <http://dx.doi.org/10.1007/s004490100251>.
- Nasri Nasrabadi MR, Razavi SH. 2010. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(4):361–368. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172309009761>.
- Olsvik E, Kristiansen B. 1994. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol. Adv.* 12(1):1–39. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4X-47GN162-2SB/2/d5944830b7ac315fa096720399a1ed23>.
- Olutiola PO, Nwaogwugwu RI. 1982. Growth, sporulation and production of maltase and proteolytic enzymes in *Aspergillus aculeatus*. *Transactions of the British Mycological Society* 78(1):105–113. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B985G-4VJ0S1K-F/2/432a2b2e7bfa1fc04672c467bc3f9e82>.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22(3):189–259. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4X-4B4VRX2-1/2/4abbf6cc9bd94e7971a91d6c5ca0d81a>.
- Park S, Fred Ramirez W. 1988. Optimal production of secreted protein in fed-batch reactors. *AIChE J* 34(9):1550–1558. <http://dx.doi.org/10.1002/aic.690340917>.
- Pauly M, Andersen LN, Kauppinen S, Kofod LV, York WS, Albersheim P, Darvill A. 1999. A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* 9(1):93–100. <http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/9/1/93>.
- Pessoa A, Vitolo M, Hustedt H. 1996. Use of  $k_{La}$  as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(1):699–709. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02941752>.
- Perkins JB, Sloma A, Hermann T, Theriault K, Zachgo E, Erdenberger T, Hannett N, Chatterjee NP, Williams II V, Jr GR, Hatch R, Pero J. 1999. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22(1):8–18. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900587>.
- Perkins JB, Pero J. 1993. Biosynthesis of Riboflavin, Biotin, Folic Acid, and Cobalamin. in: *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.:319–334.
- Pertev C, Türker M, Berber R. 1997. Dynamic modeling, sensitivity analysis and parameter estimation of industrial yeast fermenters. Supplement to Computers and Chemical Engineering 6th International Symposium on Process Systems Engineering and 30th European Symposium on Computer Aided Process Engineering. *Computers & Chemical Engineering* 21, Supplement(0):S739. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135497875916>.

- Pirt SJ. 1966. A Theory of the Mode of Growth of Fungi in the Form of Pellets in Submerged Culture. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 166(1004):369–373. <http://www.jstor.org/stable/75597>.
- Plackett RL, Burman JP. 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 33 (4):305–325.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5):577–591. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>.
- Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. 2005a. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol. Bioeng.* 89(5):512–523. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20352>.
- Puskeiler R, Kusterer A, John GT, Weuster-Botz D. 2005. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42(3):227–235. <http://dx.doi.org/10.1042/BA20040197>.
- Rantanen H, Virkki L, Tuomainen P, Kabel M, Schols H, Tenkanen M. 2007. Preparation of arabinoxylobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-[beta]-d-xylanase. *Carbohydrate Polymers* 68(2):350–359. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-4MSR8R2-1/2/adfb5558e30bfc8b2308b21b91ab33e>.
- Reese ET (1976) History of the cellulase program at the U. S. Army Natick Development Center. *Biotechnol Bioeng Symp* 6:9–20
- Romanowska I, Polak J, Bielecki S. 2006. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(6):665–671. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0011-0>.
- Ronen M, Shabtai Y, Guterman H. 2002. Optimization of feeding profile for a fed-batch bioreactor by an evolutionary algorithm. *Journal of Biotechnology* 97(3):253–263. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165602001062>.
- Roubos JA, van Straten G, van Boxtel AJB. 1999. An evolutionary strategy for fed-batch bioreactor optimization; concepts and performance. *Journal of Biotechnology* 67(2-3):173–187. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165698001746>.
- Rubin EM. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454(7206):841–845. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07190>.
- Ruy, D. Y. and Humphrey, A. E. (1972). A reassessment of oxygen-transfer rates in antibiotics fermentations. *J. Ferment. Technol.*, 50, 424-431.)
- Ryu DDY, Mandels M. 1980. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 2(2):91–102. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-476TYPH-2W/2/e5d0caf383fe9c329134feb65df4ded4>.
- Saha B. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(5):279–291. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>.
- Saha BC, Jordan DB, Bothast RJ. 2009. Enzymes, Industrial (overview). In: Moselio Schaechter, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press. p 281–294.
- Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyysönen E, Bhatia A, Ward M, Penttilä M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269(17):4202–4211. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x>.

- Saraswat V, Lee J, Kim DY, Park Y. 2000. Synthesis of recombinant human interleukin-2 via controlled feed of lactose-complex media in fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pT7-G3IL2]. *Biotechnology Letters* 22(4):261–266. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005638602146>.
- Sarkar D, M. Modak J. 2003. Optimisation of fed-batch bioreactors using genetic algorithms. *Chemical Engineering Science* 58(11):2283–2296. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250903000952>.
- Schneider G, Strehaiano P, Taillandier P. 2001. Improvement of a fed-batch process for high level xylanase production by a *Bacillus* strain. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 76(5):456–460. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.415>.
- Schuster A, Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3):787–799. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- Serrano-Ruiz JC, West RM, Dumesic JA. 2010. Catalytic Conversion of Renewable Biomass Resources to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 1(1):79–100.
- Sheir-Neiss G, Montenecourt BS. 1984. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 20(1):46–53. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00254645>.
- Simoes MLG, Tauk-Tornisielo SM, Tapia DMT. 2009. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (22):6317–6326.
- Skjøt, Kauppinen, Kofod, Fuglsang, Pauly, Dalbøge, Andersen. 2001. Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. oryzae* and tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* 265(5):913–921. <http://dx.doi.org/10.1007/s004380100489>.
- Smith DC, Wood TM. 1991. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and  $\beta$ -xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng* 38(8):883–890. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260380810>.
- Smith GM. 1995. The Nature of Enzymes. in: Rehm HJ, Reed G. *Biotechnology. Volume 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim: 5-72.
- Sjöström, E. 1993. *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, 2nd ed. Academic Press. New York/London.
- Souci SW, Fachmann W, Kraut H, 2005, *Der kleine Souci/Fachmann/Kraut. Lebensmitteltabelle für die Praxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Srivastava RK, Wangikar PP. 2008. Combined effects of carbon, nitrogen and phosphorus substrates on D-ribose production via transketolase deficient strain of *Bacillus pumilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 83(8):1110–1119. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1936>.
- Stahmann K, Revuelta JL, Seulberger H. 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(5):509–516. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051649>.
- Stahmann K, Arst HN, Althöfer H, Revuelta JL, Monschau N, Schlüpen C, Gätgens C, Wiesenburg A, Schlösser T. 2001. Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environmental Microbiology* 3(9):545–550. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00225.x>.

- Steele GC, Trinci APJ. 1975. Morphology and Growth Kinetics of Hyphae of Differentiated and Undifferentiated Mycelia of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* 91(2):362–368.
- Sternberg D. 1976. A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 18(12):1751–1760. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260181209>.
- Sternberg D, Dorval S. 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 21(2):181–191. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260210205>.
- Sumner JB, With the assistance of V. A. Graham. 1921. Dinitrosalicylic acid: A Reagent for the estimation of Sugar in normal and diabetic Urine. *Journal of Biological Chemistry* 47(1):5–9. <http://www.jbc.org/content/47/1/5.short>.
- Sumner JB, Somers G. 1949. Dinitrosalicylic method for glucose. in: *Laboratory experiments in biological chemistry*. New York: Academic Press: 38-39
- Szendefy J, Szakacs G, Christopher L. 2006. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 39(6):1354–1360. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022906003401>.
- Tangnu SK, Blanch HW, Wilke CR. 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and beta-glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). *Biotechnol. Bioeng.* 23(8):1837–1849. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260230811>.
- Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K. 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochemistry* 38(9):1327–1340. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920200331X>.
- The Coca-Cola Company, 14.05.2009, Pressemeldung: The Coca-Cola Company Introduces Innovative Bottle Made From Renewable, Recyclable, Plant-Based Plastic, [http://www.thecoca-colacompany.com/dynamic/press\\_center/2009/05/the-coca-cola-company-introduces-innovative-bottle-made-from-renewable-recyclable-plant-based-plasti-1.html](http://www.thecoca-colacompany.com/dynamic/press_center/2009/05/the-coca-cola-company-introduces-innovative-bottle-made-from-renewable-recyclable-plant-based-plasti-1.html)
- Tholudur A, Ramirez WF, McMillan JD. 1999. Mathematical modeling and optimization of cellulase protein production using *Trichoderma reesei* RL-P37. *Biotechnol. Bioeng* 66(1):1–16. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:1<1:AID-BIT1>3.0.CO;2-K](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:1<1:AID-BIT1>3.0.CO;2-K).
- Uhlig H. 1991. *Enzyme arbeiten für uns: technische Enzyme und ihre Anwendung*. Carl Hanser Verlag, München, Wien.
- van Loon APGM, Hohmann H, Bretzel W, Hümbelin M, Pfister M. 1996. Development of a Fermentation Process for the Manufacture of Riboflavin. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 50:410–412. <http://www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/1996/00000050/00000009/art00003>.
- Vester A, Hans M, Hohmann H, Weuster-Botz D. 2009a. Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1):71–76. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-1966-z>.
- Vester A. 2009b. *Reaktionstechnische Untersuchungen zur mikrobiellen Riboflavin-Herstellung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren*. Dissertation. TU München
- Villadsen J, Nielsen J, Lidén G. 2011. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London.
- Vogel H. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbial. Genet.* Bull 13:42–43.

- Westers L, Westers H, Quax WJ. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Protein Export/Secretion in Bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1694(1-3):299–310.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488904000837>.
- Weuster-Botz D. 1999. Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich.
- Weuster-Botz D. 2005. Parallel Reactor Systems for Bioprocess Development. In: Kragl U, editor. Technology Transfer in Biotechnology: Springer Berlin / Heidelberg. p 125–143.
- Wittier R, Baumgartl H, Lübbers DW, Schügerl K. 1986. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. Biotechnol. Bioeng 28(7):1024–1036. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260280713>.
- Wolfenden R, Snider MJ. 2001. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. Accounts of Chemical Research 34(12):938–945.  
<http://dx.doi.org/10.1021/ar000058i>.
- Wu Q, Chen T, Gan Y, Chen X, Zhao X. 2007. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. Applied Microbiology and Biotechnology 76(4):783–794. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1049-y>.
- Yuan Q, Wang J, Zhang H, Qian Z. 2005. Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. Process Biochem. 40(10):3255–3257.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4G7DYBH-8/2/773e757586ad856fc764691c38ad3bc6>.
- Zamboni N, Mouncey N, Hohmann H, Sauer U. 2003. Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. Metabolic Engineering 5(1):49–55.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717603000077>.
- Zamboni N, Fischer E, Muffler A, Wyss M, Hohmann H, Sauer U. 2005. Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Bioeng 89(2):219–232.  
<http://dx.doi.org/10.1002/bit.20338>.
- Zuo K, Wu WT. 2000. Semi-realtime optimization and control of a fed-batch fermentation system. Computers & Chemical Engineering 24(2-7):1105–1109.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135400004907>.

## 10 Abkürzungs- und Variablenverzeichnis

### 10.1 Abkürzungen

AK	Autoklavieren
BGL I und II	$\beta$ -D-Glukosidase
BTM	Biotrockenmasse
$\beta$ -Xylosidase	1,4- $\beta$ -D-Xylan Xylohydrolase
CBH1	Cellobiohydrolase 1
C/N-Verhältnis	Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff im Kulturmedium
DMRL	6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin
DNS	Dinitrosalicylsäure
EG I und II	Endoglucanase I und II
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FPU	Filterpapier Units
Gen2In6	Satzmedium für die Riboflavinproduktion
Gen4Ind10	Satzmedium für die Riboflavinproduktion
Gen8Ind14	Satzmedium für die Riboflavinproduktion
GRAS	Generally recognized as safe
GTP	Guanosine-Triphosphat
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
$k_L a$	volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
OTR	Oxygen Transfer Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pNPC	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-cellobioside
pNPG	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-glukopyranoside
pNPGal	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-Galactopyranoside
pNPX	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-Xylopyranoside
pO <sub>2</sub>	gelöste Sauerstoffkonzentration
RF	Riboflavin

RSM	Response Surface Methodology
RZu	Referenzkultivierung mit Zulauf
SF	Sterilfiltration
SK	Schüttelkolben
V	Volumen
VE-H <sub>2</sub> O	Voll entmineralisiertes Wasser
Xylanase	1,4-β-D-Xylan Xylanohydrolase

## 10.2 Variablen

Variable	Bedeutung	Einheit
$\mu$	Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{\max}$	Maximale Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$Abs_{444}$	Absorption bei 444 nm	-
$c_L^*$	Sauerstoffkonzentration in der flüssigkeitsseitigen Grenzschicht	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c_L$	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c_{RF}$	Riboflavinkonzentration	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c_x$	Biomassekonzentration	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$d$	Durchmesser	m
$E_x$	Extinktion der x. Messung	-
$F_{aus}$	Volumenstrom aus dem Reaktor	$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
$F_{ein}$	Volumenstrom in den Reaktor	$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
$H$	Henry-Konstante	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$
$k$	Konstante	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$K$	Konsistenzindex	$\text{Pa}\cdot\text{s}^m$
$k_L a$	Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient	$\text{s}^{-1}$
$K_M$	Michaelis-Konstante	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$K_S$	Sättigungskonstante des Substrat S	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$M$	Biomasse eines Pellets	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$m$	Fließindex	-
$m_{\text{leer}}$	Leergewicht eines Kulturgefäßes	g
$m_{\text{voll}}$	Gewicht eines Kulturgefäßes mit BTM-Probe	g
$OTR$	Oxygen Transfer Rate	$\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$
$OUR$	Oxygen Uptake Rate	$\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$ oder $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$
$p$	Partialdruck im Gas	Pa
$P$	Leistung	W
$P\cdot V^l$	Volumenspezifischer Leistungseintrag	$\text{W}\cdot\text{L}^{-1}$
$q_P$	Spezifische Produktbildungsrate	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$q_S$	Spezifische Substrataufnahmerate	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$q_{S,\mu}$	Substrataufnahmerate für Zellwachstum	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

<b>Variable</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Einheiten</b>
$q_{S,m}$	Substrataufnahmerate für Erhaltungsstoffwechsel	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Substrataufnahmerate für Produktbildung	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$r_S$	Reaktionsvariable des Stoffes $S$	$\text{s}^{-1}$
$t$	Zeit	h
$u_G$	Gasleerrohrgeschwindigkeit	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
$v$	Reaktionsgeschwindigkeit	$\text{s}^{-1}$ oder $\text{min}^{-1}$
$V$	Volumen	$\text{m}^3$ oder L
$v_{max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit	$\text{s}^{-1}$ oder $\text{min}^{-1}$
$x_k$	Kodierte Variable $k$ zum Polynomansatz 2. Grades	-
$Y_{P/S}^*$	Differentielle Produktausbeute	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Y_{X/S}^*$	Differentielle Biomasseausbeute	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Y_{P/S}$	Integrale Produktausbeute	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Y_{X/S}$	Integrale Biomasseausbeute	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$\beta_i$	Linearer Parameter zum Polynomansatz 2. Grades	-
$\beta_{ii}$	Quadratischer Parameter zum Polynomansatz 2. Grades	-
$\beta_{ij}$	Interaktions Parameter zum Polynomansatz 2. Grades	-
$\gamma$	Schergeschwindigkeit	$\text{s}^{-1}$
$\eta_{Sch}$	Scheinbare Viskosität	$\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$
$\rho$	Dichte	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$\rho_P$	Dichte eines Pellets	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Chemische Struktur des Riboflavinmoleküls.....	8
Abbildung 3.2: Riboflavinbiosynthese (nach Bacher et al., 2000; Perkins und Pero, 1993)...	10
Abbildung 3.3: rib-Operon in <i>B. subtilis</i> (nach Perkins-und Pero, 1993).....	11
Abbildung 3.4: Energiediagramm einer enzymatischen Reaktion (nach Uhlig, 1991) .....	13
Abbildung 3.5: Lignocellulose und deren Bestandteile (aus Rubin, 2008) .....	15
Abbildung 3.6: Enzymatischer Abbau von Cellulose .....	17
Abbildung 3.7: Xylanasen (nach Collins, 2005; Polizeli et al., 2005).....	18
Abbildung 3.8: Wachstumskurve von Mikroorganismen .....	21
Abbildung 3.9: Zweifilmmodell und Sauerstoffübergang (nach Villadsen et al., 2011) .....	24
Abbildung 3.10: Zeitliche und örtliche Konzentrationsverläufe im idealen Rührkesselreaktor .....	26
Abbildung 3.11: Darstellung eines allgemeinen Prozesses (aus Montgomery, 2008).....	30
Abbildung 3.12: Experimentelle Optimumssuche (nach Weuster-Botz, 1999).....	31
Abbildung 3.13: Aufbau der Kodierung eines Genetischen Algorithmus mit binärer und Echtwertkodierung (A, aus Roubos et al., 1999) und die Funktion von Crossover und Punktmutation während der Bildung einer neuen Generation (B, aus Martejjn et al., 2002) .....	32
Abbildung 3.14: Prozess in diskreten Schritten (A, aus Chaudhuri und Modak, 1998). Aufbau von neuronalen Netzen als einschichtiges <i>feedforward</i> -Netz (B) und mehrschichtiges <i>feedforward</i> -Netz mit einer versteckten Schicht (hidden layer) (C). .....	34
Abbildung 4.1: Versuchsaufbau für Prozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab.....	49
Abbildung 4.2 Versuchsaufbau für Riboflavinproduktionsprozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab .....	50
Abbildung 4.3: Versuchsaufbau für Prozesse in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab ..	54
Abbildung 4.4: Bearbeitung von Rohdaten der online gemessenen Lebendbiomassekonzentration .....	56
Abbildung 4.5: Versuchsplan zur Identifikation der Parameter eines Polynoms zweiter Ordnung .....	62
Abbildung 5.1: Riboflavinproduktion im Millilitermaßstab .....	66
Abbildung 5.2: Riboflavinproduktion im Millilitermaßstab mit reduziertem Ammoniumsulfatzulauf .....	67

Abbildung 5.3: Ammoniumkonzentrationen bei der Riboflavinproduktion im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	70
Abbildung 5.4: Vergleich der integralen Riboflavinausbeute im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	71
Abbildung 5.5: Steigerung der integralen Riboflavinausbeuten nach 48 h im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab .....	72
Abbildung 6.1: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Xylanaseproduktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	77
Abbildung 6.2: Einfluss löslicher Zucker auf die Xylanaseaktivität von <i>A. aculeatus</i> .....	78
Abbildung 6.3: Vergleich von Satzprozessen zur Xylanaseproduktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	79
Abbildung 6.4: Vergleich des pH für alle Experimente mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 zur Optimierung der Xylanaseproduktion .....	80
Abbildung 6.5: Korrelation zwischen dem pH nach 96 h und der Zugabe von Ammoniumnitrat und Laktose über das Zulaufmedium .....	81
Abbildung 6.6: Extrazelluläre Proteinkonzentration nach 96 h mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	82
Abbildung 6.7: Xylanaseaktivitäten nach 96 h mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	83
Abbildung 6.8: $\beta$ -Xylosidase- und $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten nach 96 h mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	84
Abbildung 6.9: Vergleich der experimentellen und geschätzten Aktivitäten .....	87
Abbildung 6.10: Graphische Darstellung des Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	89
Abbildung 6.11: Volumetrische Xylanaseaktivität von <i>A. aculeatus</i> in Abhängigkeit von zwei Variablen .....	89
Abbildung 6.12: Graphische Darstellung des identifizierten Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	91
Abbildung 6.13: Reaktoren und Rührer nach einer Kultivierung mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 zur Optimierung der Xylanaseproduktion im Millilitermaßstab .....	92
Abbildung 6.14: Xylanaseproduktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	95
Abbildung 6.15: Verlauf der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Zulaufkultivierungen von <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 zur Produktion von Xylanasen .....	96
Abbildung 6.16: Vergleich der Skalierbarkeit von Experimenten zur Optimierung der Xylanaseproduktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 .....	97
Abbildung 7.1: Cellulaseproduktion von <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor mit variierendem pH (Satzverfahren) .....	101
Abbildung 7.2: Cellulaseaktivitäten von <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Satzverfahren und finaler pH bei unterschiedlichen Puffern nach 96 h .....	102
Abbildung 7.3: Cellulaseaktivitäten und pH von <i>T. reesei</i> RUT-C30 bei unterschiedlichen Cellulose-konzentrationen nach 96 h .....	103

Abbildung 7.4: Enzymaktivitäten von <i>T. reesei</i> RUT-C30 in parallel betriebenen Schüttelkolben .....	104
Abbildung 7.5: Cellulaseaktivität von <i>T. reesei</i> RUT-C30 in parallel betriebenen Schüttelkolben .....	104
Abbildung 7.6: Cellulaseaktivität von <i>T. reesei</i> RUT-C30 in parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab nach 96 h.....	105
Abbildung 7.7: Enzymaktivitäten von <i>T. reesei</i> RUT-C30 in parallelen Rührkesselreaktoren nach 96 h.....	105
Abbildung 7.8: pO <sub>2</sub> -Verlauf von parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab .....	106
Abbildung 7.9: Cellulaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen von <i>T. reesei</i> RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Milliliter und Litermaßstab (Satzkultivierungen) .....	107
Abbildung 7.10: Reaktoren und Rührer aus einer Kultivierung mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 zur Optimierung der Cellulaseproduktion im Millilitermaßstab .....	110
Abbildung 7.11: Trockenmassekonzentration von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit .....	111
Abbildung 7.12: pH von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit.....	112
Abbildung 7.13: Proteinkonzentrationen von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit .....	114
Abbildung 7.14: Enzymaktivitäten von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit .....	115
Abbildung 7.15: Cellulaseaktivität von Experimenten zur Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 nach 96 h Prozesszeit .....	117
Abbildung 7.16: Modellierungsergebnisse der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab (Cellulaseaktivität nach 96 h).....	119
Abbildung 7.17: Vergleich von geschätzter und experimenteller Cellulaseaktivität für die Optimierung der Cellulaseproduktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab .....	120
Abbildung 7.18: Vergleich der Betriebsbedingungen mit variierenden Sauerstoffkonzentrationen in der Zuluft.....	124
Abbildung 7.19: Trockenmassekonzentration und Lebendbiomassekonzentration in Zulaufverfahren mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	126
Abbildung 7.20: Ammoniumkonzentrationen und pH in Zulaufverfahren mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab.....	127
Abbildung 7.21: Cellulaseaktivitäten in Zulaufverfahren mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 in Rührkesselreaktoren im Litermaßstab .....	129

Abbildung 7.22: Vergleich von Cellulaseaktivitäten von <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor in Milliliter- und Litermaßstab .....	131
Abbildung 7.23: Immobilisierte Biomasse an Rührorganen im Milliliter-maßstab.....	132
Abbildung 8.1: Steigerung der integralen Riboflavinausbeuten nach 48 h im Rührkesselreaktor im Milliliter- und Litermaßstab .....	135
Abbildung 8.2: Graphische Darstellung des identifizierten Modells zur volumetrischen Xylanaseaktivität von <i>A. aculeatus</i> DSM 2344.....	136
Abbildung 8.3: Vergleich von Cellulaseaktivitäten von <i>T. reesei</i> im Rührkesselreaktor in Milliliter- und Litermaßstab .....	137

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Stammlösungen der Medienzusätze zur Riboflavinproduktion .....	37
Tabelle 4.2: Stammlösungen zur Erstellung von Satzmedien für die Riboflavinproduktion .....	37
Tabelle 4.3: Vorkulturmedium I zur Riboflavinproduktion.....	38
Tabelle 4.4: Vorkulturmedium II zur Riboflavinproduktion .....	38
Tabelle 4.5: Referenzmedium zur Riboflavinproduktion .....	39
Tabelle 4.6: Schema zum Ansetzen von weiteren Satzmedien zur Riboflavinproduktion .....	39
Tabelle 4.7: Stammlösungen zum Ansetzen der Zulaufösungen zur Riboflavinproduktion .....	40
Tabelle 4.8: Stickstoffkonzentrationen in Zulaufmedien zur Riboflavinproduktion .....	40
Tabelle 4.9: Stammlösung zur Erstellung von Medien für die Hemicellulase und Cellulaseproduktion.....	42
Tabelle 4.10: 1000x Spurenelementlösung für das Vogel-Medium .....	42
Tabelle 4.11: 50x Vogels-Lösung zur Erstellung des Vogels-Medium .....	43
Tabelle 4.12: Zusammensetzung des Vogels-Medium, zur Kultivierung von <i>A.</i> <i>aculeatus</i> DSM 2344 .....	43
Tabelle 4.13: 2000x Spurenelementlösung für das Mandels-Medium .....	43
Tabelle 4.14: 25x Mandels-Lösung zur Erstellung des Mandels-Medium. ....	44
Tabelle 4.15: Zusammensetzung des Mandels-Medium zur Kultivierung von <i>T. reesei</i> RUT-C30 .....	44
Tabelle 4.16: Natriumcitrat-Puffer für Enzymtests .....	46
Tabelle 4.17: Prozessparameter für Kultivierungen zur Herstellung von Riboflavin .....	48
Tabelle 4.18: Inkubationsparameter für Vorkulturen zur Herstellung von Hemicellulasen und Cellulasen .....	51
Tabelle 4.19: Prozessparameter zur Herstellung von Hemicellulasen und Cellulasen .....	52
Tabelle 4.20: Durchführung und Volumina des Ammoniaktests in zwei Maßstäben .....	58
Tabelle 4.21: Durchführung von <i>p</i> -Nitrohenyl basierten Enzymtests.....	59
Tabelle 4.22: Verwendete Substratmengen zur Identifikation der Modellparameter .....	63
Tabelle 4.23: Experimenteller Versuchsplan der kodierten Variablen zur Lösung des Polynoms zweiter Ordnung .....	63
Tabelle 5.1: Stickstoffkonzentrationen in Zulaufmedien zur Riboflavinproduktion .....	67
Tabelle 5.2: Prozessparameter für Riboflavinproduktionsprozesse im Rührkesselreaktor.....	69

Tabelle 6.1: Experimentelle Ergebnisse und Schätzungen einer Parameteridentifikation zur: Xylanase- und $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 im Zulaufverfahren .....	87
Tabelle 6.2: Identifizierte Modellparameter: Xylanase- und $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit <i>A. aculeatus</i> im Zulaufverfahren.....	88
Tabelle 6.3: Validierung des ‚Xylnasemodels‘ .....	90
Tabelle 6.4: Statistische Analyse der identifizierten Modelle zur Xylanase- und $\beta$ -Xylosidase-Produktion mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 im Zulaufverfahren .....	90
Tabelle 6.5: Validierung des ‚Xylosidasemodels‘ .....	91
Tabelle 6.6: Prozessparameter für Produktionsprozesse mit <i>A. aculeatus</i> DSM 2344 im Rührkesselreaktor .....	94
Tabelle 7.1: Cellulase-Produktion mit <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 im Zulaufverfahren im Rührkessel-reaktor im Millilitermaßstab: Messergebnisse und geschätzte Cellulaseaktivitäten nach 96 h.....	118
Tabelle 7.2: Identifizierte Modellparameter für die Cellulase-Produktion mit <i>T. reesei</i> RUT-C30.....	119
Tabelle 7.3: Statistische Analyse des identifizierten Modells zur Cellulase-Produktion mit <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 im Zulaufverfahren .....	120
Tabelle 7.4: Ergebnisse der Validierungsexperimente zur Produktion von Cellulasen mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab.....	121
Tabelle 7.5: Prozessparameter für Produktionsprozesse mit <i>T. reesei</i> RUT-C30 im Rührkesselreaktor .....	125
Tabelle 13.1: Geräte für Kultivierungen im Millilitermaßstab .....	159
Tabelle 13.2: Geräte für Kultivierungen im Litermaßstab .....	159
Tabelle 13.3: Laborgeräte für Kultivierung, Vorbereitung und Analytik .....	160
Tabelle 13.4: Verbrauchsmaterialien .....	160
Tabelle 13.5: Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien .....	161

## 13 Anhang

### 13.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 13.1: Geräte für Kultivierungen im Millilitermaßstab

Gerät	Hersteller	Typ
Autoklavierbox	Wagner, München	SteriSet container, N-model
bioREACTOR	2mag, München	Magnetischer Antriebsblock, Deckel mit Achsen und Rührern und Antriebssteuerung
Elisa-Wascher	Tecan, Crailsheim	Columbus MTP Washer 16x
Gasmischstation	Brooks Instruments, Hatfield, USA	Q0254 + 4 MFC
Kühlaggregat	G.Heinemann, Gmünd	-10 – 40 °C
Laborroboter	Tecan, Crailsheim	Genesis RSP 150, mit Low-Volume Ausstattung
MTP-Carrier	TUM, Werkstatt BioVT	6x und 3x
Optischer Sensorriegel	Presens, Regensburg	MCR 8pH+8oxygen v1
Photometer	BMG Labtechnologies, Offenburg	Fluostar Galaxy
Prozesssoftware	DasGip, Jülich	Fedbatch-XP v1.0.248
Rührer	2mag, München	Gasinduzierende Rührer und Paddelrührer
Software	Tecan, Crailsheim	Gemini v3.40 SP2 und v4.2
Wasserbad	Thermo Haake, Karlsruhe	W15 mit Temperaturkontrolle C10

Tabelle 13.2: Geräte für Kultivierungen im Litermaßstab

Gerät	Hersteller	Typ
Laborbioreaktor	Infors HT, Bottmingen	Labfors 2, 7,5L-Glasgefäß
Abgasanalytik	ABB	EasyLine (O2, CO2)
Biomassesonde	Fogale nanotech, Nimes, Frankreich	iSensor DN12-420, long range
Biomassensystem	Fogale nanotech, Nimes, Frankreich	iBiomass System i465
pH-Elektrode	Mettler-Toledo, Gießen	HA405-DPA-SC-S8
pO2-Sonde	Mettler-Toledo, Gießen	InPro 6000
Schlauchpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld	BVP Standard #ISM444
Software	Infors HT, Bottmingen	IRIS-NT PRO Balance V4.11 bzw. V5.4 process
Waage für Reaktor	Sartorius, Göttingen	QC35 EDE-S
Waage für Zulaufmedium	Sartorius, Göttingen	I 6800

Tabelle 13.3: Laborgeräte für Kultivierung, Vorbereitung und Analytik

Gerät	Hersteller	Typ
Autoklav	Systec, Wetzlar	Systec 5075 ELV
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim	Varioklav 500E
Einstrahlphotometer	Thermo Spectronic, Neuss	Genesys 20
Inkubator, 30 °C	Memmert, Schwabach	
Laborwaage	Ohaus, Gießen	Explorer E1M213
Laborwaage	Ohaus, Gießen	Explorer E12145
Laborwaage	Sartorius, Göttingen	ED124S
Laborwaage	Mettler Toledo, Gießen	AC88
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen	Axiolab drb KT
MTP-Schüttler	H+P Labortechnik, Oberschleißheim	Variomag, monoshake
MTP-Thermoschüttler	neoLab, Heidelberg	DTS-2
pH-Meter	Mettler-Toledo, Gießen	SevenMulti Ion
Photometer für MTP	Tecan, Männedorf	Infinite 200
Rührplatte	H+P Labortechnik, Oberschleißheim	Monotherm
Schüttelinkubator	Infors HT, Bottmingen	Multitron
Schüttler	neoLab, Heidelberg	Overhead rotator, intelli mix
Trockenschrank, 80 °C	Binder, Tuttlingen	9010-0080
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg	N840.3FT.40.18
Vortex	Heidolph, Kehlheim	REAX top
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, USA	Vortex Genie 2, G650E
Wasserbad 100 °C	Büchi Labortechnik, Flawil	B465
Wasserbad 50 °C	IKA, Staufen	EH1
Zentrifuge	Kendro-Heraeus, Langenselbold	Biofuge Stratus
Zentrifuge	Heraeus, Hanau	Biofuge Pico
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen	Mikro 20

Tabelle 13.4: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 mL Safe-Lock Reaktionsgefäße, #0030 120.086	Eppendorf, Hamburg
15 mL Reaktionsgefäße, #188271	Greiner Bio-one,
2,0 mL Safe-Lock Reaktionsgefäße, #0030 120.094	Eppendorf, Hamburg
96-Well Mikrotiterplatte, F96	Nunc, Wiesbaden
Abgasfilter, Sartobran 300, #5123333	Sartorius, Göttingen
Accu-Check comfort, #3021858 003	Roche Diagnostics, Mannheim
AcroPrep 96 mit Glasfaser/Bio-Inert-Membran, 1 mL, 0,2 µm, #516-6896	Pall, Dreieich
HPLC-Spritzenvorsatzfilter 15 mm, unsteril, #315 29 02	Thermo Fisher, Schwerte
HydroPlate	Presens, Regensburg
Luftfilter, Midisart® 2000 PTFE 0.2 µm, #512-3250	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm), #P298.1	Carl Roth, Karlsruhe

## 13.2 Verwendete Chemikalien

**Tabelle 13.5:** Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien

Komponente	Hersteller
Veal Infusion Broth	Fa. Difco, Nr 234420
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Nr. 1.01217 bzw. Fa. Roth, Nr. 3746
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	Fa. Merck, Nr 1.01182
3-5-Dinitrosalicylsäure	Fa. Sigma, Nr. 128848
AlCl <sub>3</sub> •6 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.01084
Ammoniak, 25 %	Fa. Roth, Nr. 5460
Avicel PH-101	Fa. Fluka, Nr. 11365
Biotin	Fa. Roth, Nr. 3822
Borsäure	Fa. Merck, Nr. 100165
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fa. Pierce, Nr. 23209
Bradford Quickstart 1x dye	Fa. Bio-Rad, Nr.500-0205
CaCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.02382
Casamino Acids	Fa. Amresco, Nr. J851
Chloramphenicol	Fa. Roche, Nr. 634 433
CoCl <sub>2</sub>	Fa. Merck, Nr 802540
CoCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr 102733
CoCl <sub>2</sub> •5 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr 102790
CoCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr 1.02539
CuCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr 1.02733
D-Xylose	Fa. Roth, Nr. 5537
Ethanol (reinst)	Fa. Merck, Nr. 100986
Fe(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	Fa. Roth, Nr. P734
FeSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	
FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.03965
Glukose•H <sub>2</sub> O	Fa. Applichem, Nr. A3617
Glycerin	Fa. Merck, Nr. 1.04169 bzw. Fa. Roth 3783
Hefeextrakt, granuliert	Fa. Merck, Nr. 1.03753
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	Fa. Merck, Nr 1.05104 bzw. Fa. Roth, Nr. P749
Kartoffel-Glukose Agar	Fa. Roth, Nr. X931
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei)	Fa. Roth, Nr. 3904
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 105941
MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.05886
MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 105941
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr 1.05941
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (wasserfrei)	Fa. Merck, Nr. 104924
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Nr. 1.06586
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.06579
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Fa. Sigma, Nr. 243655
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Nr. 822286
NaCl	Fa. Roth, Nr. 3957
Na-Glutamat•H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.06445
NaNO <sub>3</sub>	Fa. Merck, Nr. 1.06537 bzw. Fa. Roth, Nr. A136
NaOH	Fa. Merck, Nr. 1.06482 bzw. Fa. Roth, Nr. P031
NH <sub>4</sub> Cl	Fa. Merck, Nr. 1.01145 bzw. Fa. Roth, Nr. 5470

<b>Komponente</b>	<b>Hersteller</b>
Pepton aus Casein	Fa. Roth, Nr. 8986
Rochelle-Salz (Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrate)	Fa. Roth, Nr. 8087
Salzsäure, 37 %	Fa. Roth, Nr. 4625
Sorbit (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> )	Fa. Merck, Nr. 1.03753
Sorbitol	Fa. Fluka BioChemika, Nr 85532
Struktol J633	Fa. Schill + Seilacher „Struktol“ AG, Nr. 02039
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Nr. 1.03965
Triton X-100	Fa. Sigma, Nr. 93443
Tween 80	Fa. Merck, Nr. 817061
Urea	Fa. Roth, Nr. X999
Veal Infusion broth	Fa. Difco, Nr. 234420
Whatman No. 1 Filterpapier	Fa. VWR, Nr. 512-1007
Xylan aus Birkenholz	Fa. Roth, Nr. 7500
Xylan aus Buchenholz	Fa. Roth, Nr. 4414
Zitronensäure	Fa. Roth, Nr. X863
Zitronensäure monohydrat	Fa. Roth, Nr. 5110
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Nr. 1.08883