

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Reaktionstechnische Charakterisierung der Lipidherstellung aus verdünnten Zuckergemischen mit *Trichosporon oleaginosus*

Andrea Meo

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.-Ing. Andreas Kremling
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 15.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 29.11.2016 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zum Gelingen dieser Arbeit haben während dieser Zeit viele Personen auf unterschiedliche Weisen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte!

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung und hilfreichen Anregungen sowie die Möglichkeit, dieses anspruchsvolle Thema bearbeiten zu dürfen.

Ferner geht mein Dank an den Korreferenten Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück und den Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück, Felix Bracharz und Martina Haack (Professur für Industrielle Biokatalyse, TUM) möchte ich mich für die Bereitstellung der oleogenen Hefe *Cryptococcus curvatus* CBS 5324 sowie für die Möglichkeit, die produzierten mikrobiellen Lipide mittels Gaschromatographie zu analysieren, bedanken.

Bei Sebastian Gumplinger, Castro Dokyi Affum, Andreas Glatt, Xenia Priebe, Katharina Kirsch, Chris Ludwig, Daniel Wehrle, Andreas Ankenbauer, Stefanie Laun und Philipp Arbter bedanke ich mich für die fleißige Mitarbeit im Rahmen von studentischen Arbeiten.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik danke ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und großartige Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht dabei an Christina Pfaffinger, Andreas Schmideder, Xenia Priebe, Hannes Löwe und Alexander Mayer für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön geht ferner an Dominik Maslak und Markus Weise für die Möglichkeit, die Anlagen am TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie zu nutzen. Besonders möchte ich mich für die Unterstützung bei der Versuchsplanung und für die Bereitschaft, zu unmöglichsten Arbeitszeiten zu arbeiten, bedanken.

Abschließend danke ich meiner gesamten Familie und insbesondere meinem Mann Alessandro von ganzem Herzen für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit. Euer Rückhalt hat mir diesen Weg erst ermöglicht.

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	3
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Kultivierung von Mikroorganismen in Rührkesselreaktoren	7
3.1.1	Stoffbilanz des idealen Rührkesselreaktors.....	7
3.1.2	Kinetik von Wachstum und Produktbildung	8
3.1.3	Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor	10
3.1.4	Zulaufverfahren im idealen Rührkesselreaktor	13
3.1.5	Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor	13
3.1.6	Prozessführung im idealen Membranbioreaktor	15
3.2	Membranbioreaktoren	15
3.2.1	Einsatz und Arten von Membranbioreaktoren.....	15
3.2.2	Querstromfiltration.....	18
3.3	Oleogene Mikroorganismen	20
3.3.1	Eigenschaften oleogener Mikroorganismen.....	20
3.3.2	Der Lipidstoffwechsel oleogener Hefen	21
3.3.3	<i>Trichosporon oleaginosus</i> und <i>Cryptococcus curvatus</i>	23
3.3.4	Einsatz und Anwendung von mikrobiellen Ölen.....	24
4	Material und Methoden.....	27
4.1	Hefestämme.....	27
4.2	Medien, Puffer und Lösungen	27
4.3	Kultivierung oleogener Hefen	29
4.3.1	Stammhaltung	29
4.3.2	Vorkulturherstellung	29
4.3.3	Parallele Satz- und Zulaufkultivierungen im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab	30
4.3.4	Satz- und Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab	32
4.3.5	Kontinuierliche Prozessführung im Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung	34
4.4	Herstellung und Vorbehandlung von Algenhydrolysat	37

4.4.1	Enzymatische Hydrolyse von Restalgenbiomasse im Liter-Maßstab	37
4.4.2	Chemische Phosphatfällung von Algenhydrolysat	37
4.5	Analytische Methoden	38
4.5.1	Bestimmung der Zellkonzentration	38
4.5.2	Bestimmung der Substratkonzentrationen	39
4.5.3	Bestimmung spezifischer Raten und Ausbeuten	42
4.5.4	Bestimmung der Lipidkonzentration	43
4.5.5	Kohlenstoffbilanz	44
5	Substratspektrum von <i>Trichosporon oleaginosus</i> und <i>Cryptococcus curvatus</i>	47
5.1	<i>Trichosporon oleaginosus</i>	47
5.1.1	Wachstum	47
5.1.2	Lipidbildung	53
5.2	<i>Cryptococcus curvatus</i>	58
5.2.1	Wachstum	58
5.2.2	Lipidbildung	64
6	Lipidproduktion mit <i>Trichosporon oleaginosus</i>	71
6.1	Einfluss des C/N-Verhältnisses	71
6.2	Einfluss des C/S-Verhältnisses	74
6.3	Einfluss des C/P-Verhältnisses	76
6.4	Einfluss des pH	79
6.5	Zulaufprozesse im Milliliter- und Liter-Maßstab	81
7	Lipidproduktion mit <i>Trichosporon oleaginosus</i> im Membranbioreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung	87
7.1	Reaktionstechnische Charakterisierung im Labormaßstab	87
7.1.1	Lipidproduktion unter N-Limitierung mit Glucose als Substrat	87
7.1.2	Lipidproduktion unter N-Limitierung mit einem Zuckergemisch als Substrat ...	90
7.1.3	Lipidproduktion unter P-Limitierung mit Glucose als Substrat	92
7.1.4	Lipidproduktion mit vorbehandeltem Algenhydrolysat	94
7.1.5	Diskussion	97
7.2	Maßstabsübertragung	101

7.2.1	Lipidproduktion unter N-Limitierung mit Glucose als Substrat.....	102
7.2.2	Lipidproduktion unter P-Limitierung mit Glucose als Substrat.....	104
7.2.3	Diskussion.....	107
7.3	Vergleich zwischen den Maßstäben	107
7.3.1	Lipidproduktion unter N-Limitierung.....	107
7.3.2	Lipidproduktion unter P-Limitierung	109
7.3.3	Fettsäurezusammensetzung	110
8	Zusammenfassung.....	113
9	Ausblick.....	117
	Literaturverzeichnis	119
	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	129
	Anhang.....	133

1 Einleitung

Der Energieverbrauch in der Bundesrepublik Deutschland 2015 zeigt eine starke Abhängigkeit von fossilen Energieträgern wie Mineralölen, Erdgas oder Kohle (Abbildung 1.1 links). Der Anteil erneuerbarer Energien liegt mit 12,6 % nur im unteren Bereich. Die begrenzten Reserven fossiler Energieträger, der weltweit steigende Energiebedarf insbesondere im Transportsektor und die Herausforderungen des Klimawandels erfordern daher eine Wende hin zu regenerativen, klimaneutralen Rohstoffquellen. Biomasse macht bereits heute den größten Rohstoffanteil bei den erneuerbaren Energien aus (Abbildung 1.1 rechts).

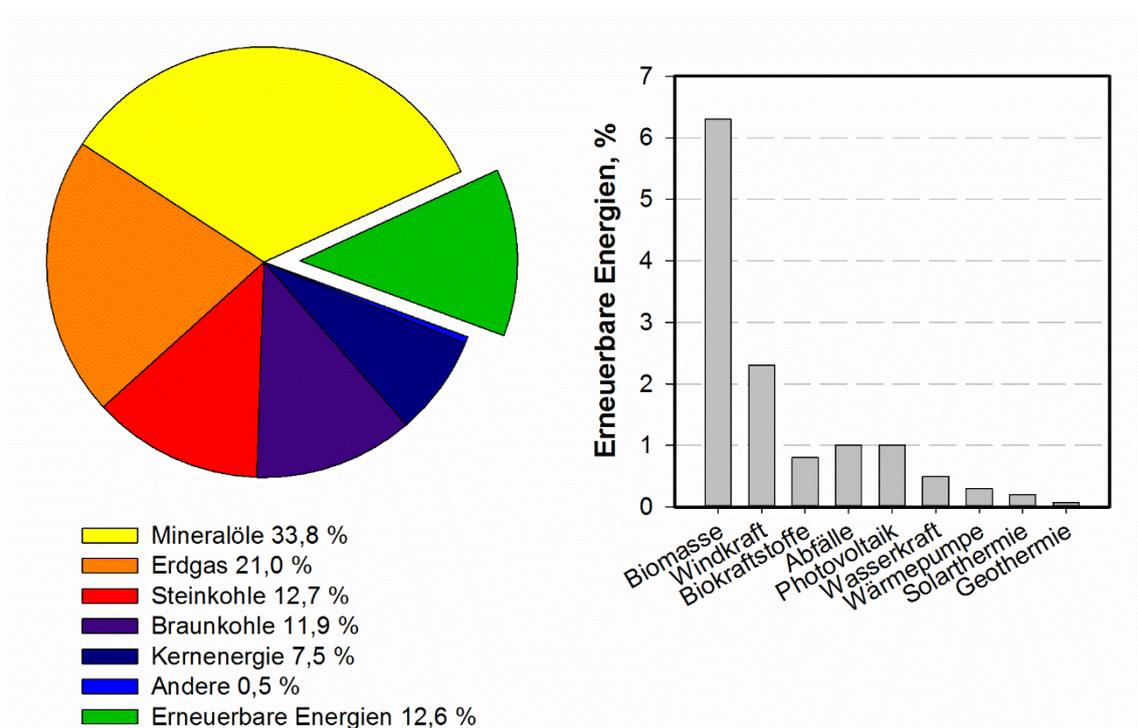


Abbildung 1.1: Energieverbrauch in der Bundesrepublik Deutschland 2015

Links: Anteil verschiedener Energieträger am Gesamtenergieverbrauch. Rechts: Anteil nachwachsender Rohstoffe als erneuerbare Energien am Gesamtenergieverbrauch. (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie, 2016)

Das andauernde Wachstum im Transportsektor mit bis zu 1,4 % pro Jahr¹ führt zu einem gesteigerten Bedarf an Biokraftstoffen wie Biodiesel, Bioethanol und Biokerosin. Zudem werden circa 60 % der zur Energiegewinnung genutzten fossilen Rohstoffe im Transportsektor verbraucht (Escobar et al., 2009). Nur mit klimaneutralen Treibstoffen und CO₂-sparenden Produktionsverfahren lassen sich Treibhausgase wie CO₂, die erheblich zum Klimawandel beitragen, verringern.

Die zurzeit eingesetzten Biokraftstoffe wie Biodiesel und Bioethanol gehören fast ausschließlich zu den Biokraftstoffen der 1. Generation. Hierbei werden Öle oder Zucker aus

¹ <http://www.handelsblatt.com/unternehmen/industrie/energieverbrauch-prognose-sieht-energiebedarf-weiter-steigen/11386132.html> (19.07.2016)

Nutzpflanzen wie Raps, Mais, Soja oder Zuckerrohr zur Biokraftstoffproduktion eingesetzt (Eisentraut, 2010). Dadurch ergeben sich jedoch Probleme wie die Konkurrenz zu Nahrungsmitteln und um Ackerflächen.

Bei der Produktion von Biokraftstoffen der 2. Generation werden vorwiegend Abfallstoffe wie Holz und Stroh oder nicht essbare Nutzpflanzen wie *Jatropha* anstelle von Nahrungsmittelpflanzen verwertet. Neben der oft aufwendigeren Umwandlung in Biokraftstoffe aufgrund des hohen Ligningehalts (Yousuf, 2012), ist ein weiterer Nachteil, dass für die Kultivierung dieser Pflanzen weiterhin wichtige Landflächen dem Anbau essbarer Nutzpflanzen entzogen werden (Eisentraut, 2010).

Daher gibt es Ansätze zur Biokraftstoffherstellung der 3. Generation, welche Mikroorganismen wie Mikroalgen zur Produktion von Ölen, die als Vorläufer von Biokraftstoffen dienen, nutzen. Hierbei entfällt zum einen die Konkurrenz um Ackerflächen und zu Nahrungsmitteln, zum anderen verbrauchen Mikroalgen CO₂ beim Wachstum, was zu einer Reduktion des Treibhausgases in der Atmosphäre führt. Allerdings stellt sich die Ölproduktion mit Mikroalgen derzeit noch als sehr kostspielig dar (Ratledge and Cohen, 2008). Um eine ganzheitliche Nutzung der Algenbiomasse zu erzielen und somit idealerweise die Wertschöpfungskette komplett auszuschöpfen und einen preiswerten Biokraftstoff zu produzieren, ist ein Ansatz die Verwendung von oleogenen Hefen zur Ölproduktion aus Restalgenbiomasse, die nach der Ölextraktion anfällt.

Mithilfe der industriellen Biotechnologie, die als „industrielle Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien, sowie Wirkstoffen mit Hilfe optimierter Enzyme, Zellen oder Mikroorganismen“ definiert wird (Fraunhofer-Gesellschaft, 2005), können ölbildende Mikroorganismen wie oleogene Hefen technisch hergestellt werden.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Der bisherige Einsatz von oleogenen Hefen beschränkt sich meist auf die Nutzung von rein synthetischen Medien zur Lipidproduktion unter aeroben Bedingungen (zum Beispiel Amaretti et al., 2010; Easterling et al., 2009; Hassan et al., 1996; Kurosawa et al., 2010; Li et al., 2007; Meesters et al., 1996; Turcotte und Kosaric, 1988; Zheng et al., 2012). In einigen Studien wird auch der Einsatz von günstigen Abfallsubstraten mit hohem Zuckergehalt betrachtet: deproteinisiertes Molkenpermeat (Davies, 1988; Moon et al., 1978), Reisstrohhydrolysat (Huang et al., 2009), Maniokstärke (Li et al., 2010), Hydrolysat aus Maisresten (Galafassi et al., 2012), Abwasser aus der Stärkeproduktion (Xue et al., 2010) und Abwasser aus Palmölmühlen (Cheirsilp und Louhasakul, 2013). Diese Abfallsubstrate enthalten wenig organischen Stickstoff oder deren Stickstoffgehalt wurde künstlich verringert. Denn oleogene Hefen beginnen erst mit der Produktion von Speicherlipiden, wenn ein Schlüsselnährstoff wie Stickstoff, Phosphor, Eisen oder anderes limitierend ist und gleichzeitig die Kohlenstoffquelle noch im Überfluss vorhanden ist. Um mit mikrobiellen Ölen eine günstige Alternative zu anderen ölhaltigen Ausgangsstoffen zum Beispiel für die Biokraftstoffherstellung zu schaffen, gilt es die Substratkosten bei der Ölherstellung möglichst gering zu halten. Das eingesetzte Medium und die verwendete Kohlenstoffquelle machen einen Großteil der Kosten der Lipidproduktion bei oleogenen Hefen aus (Ratledge und Cohen, 2008; Ryu et al., 2012; Thiru et al., 2011). Daher ist die Entwicklung von Prozessen zur Lipidproduktion aus günstigen Abfallstoffen nötig (Li et al., 2008). Hierbei können pflanzliche Reststoffe als Substrate verwendet werden (Yousuf, 2012).

Tabelle 2.1: Zuckerszusammensetzung von ausgewählten Mikroalgenpezies (**Hauptzucker**)

Zucker (% w/w)	Mikroalge				
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Scenedesmus costatum</i>	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Chlorococcum</i> sp.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Arabinose	0,0	1,4	11,7	-	-
Galactose	3,8	7,0	12,9	9	4,5
Glucose	68,2	62,0	42,6	47	74,9
Mannose	6,1	11,4	13,2	15	2,3
Rhamnose	8,3	6,6	2,1	-	1,5
Xylose	4,4	2,8	10,3	27	-
Referenz	(Brown, 1991)	(Brown, 1991)	(Brown, 1991)	(Harun und Danquah, 2011)	(Choi et al., 2010)

Als Beispiel für pflanzliche Reststoffe wird in dieser Arbeit ein Hydrolysat aus (entölter) Mikroalgenrestbiomasse, die für die weitere stoffliche Verwertung kostengünstig zur Verfügung steht, zur Lipidproduktion genutzt. Zellwände von Mikroalgen bestehen unter

anderem aus Hemicellulose und Cellulose, die als strukturelle Komponenten dienen (Markou et al., 2012; Richmond und Hu, 2013). Nach Hydrolyse bilden diese ein komplexes Gemisch aus Pentosen und Hexosen (Blumreisinger et al., 1983; Brown, 1991). Die eingesetzten Ölhefen müssen dieses Zuckergemisch möglichst simultan und komplett zur Lipidproduktion verstoffwechseln können. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht über die enthaltenen Zucker und deren Zusammensetzung in ausgewählten Mikroalgenpezies. Die hauptsächlich vorkommenden Zucker sind hierbei Glucose, Galactose und Mannose. Daher müssen geeignete oleogene Hefen hinsichtlich ihres Substratspektrums reaktionstechnisch charakterisiert werden. Vor allem in den Gattungen *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus* und *Trichosporon* finden sich oleogene Hefespezies (Ageitos et al., 2011; Beopoulos et al., 2011). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der oleogenen Hefe *Trichosporon oleaginosus*, die für ihr breites Substratspektrum bekannt ist (Gujjari et al., 2011). Neben den Hexosen Glucose und Mannose kann *T. oleaginosus* auch die Pentose Xylose sowie Disaccharide wie Lactose oder Cellobiose verstoffwechseln (Evans und Ratledge, 1983a; Moon et al., 1978; Yu et al., 2014b). Heredia und Ratledge (1988) und Yu et al. (2014b) beschreiben zudem die simultane Verwertung von Glucose und Xylose durch *T. oleaginosus*. Die oleogene Hefe *Cryptococcus curvatus* wurde als Referenzstamm ausgewählt, da sie ebenfalls ein breites Substratspektrum besitzt und beispielsweise Glucose, Arabinose oder Acetat verwerten kann (Christophe et al., 2012; Knoshaug et al., 2009; J. Zhang et al., 2011). Für diese Hefen sollen bei der reaktionstechnischen Charakterisierung Substrataufnahmeraten, Wachstumsraten und Biomasseausbeuten sowohl mit Einzelzuckern als auch mit einem Zuckergemisch als Substrat bestimmt werden. Zusätzlich soll die Lipidbildung hinsichtlich Lipidgehalt und Lipidausbeute vergleichend charakterisiert werden.

Eine weitere Herausforderung ist der niedrige Zuckergehalt, der sich nach Hydrolyse aus Mikroalgenrestbiomasse gewinnen lässt. Bei unlimitiertem Wachstum enthalten viele Mikroalgenpezies nur zwischen 5 - 20 % Kohlenhydrate (Brown, 1991; Markou et al., 2012; Richmond und Hu, 2013; Templeton et al., 2012). Unter der Annahme eines mittleren Kohlenhydratanteils von 10 % bedeutet dies, dass bei einer Biomassekonzentration von $250 \text{ g}_{\text{Algen}} \text{ L}^{-1}$ und vollständiger enzymatischer Hydrolyse nur $\sim 25 \text{ g L}^{-1}$ Zucker im Hydrolysat vorzufinden sind. Setzt man dieses Hydrolysat unter der Annahme einer Lipidausbeute Y_{LS} von $0,2 \text{ g}_{\text{Lipid}} \text{ g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ als Satzmedium für oleogene Hefen ein (Ratledge und Cohen, 2008), erhält man nur 5 g L^{-1} Lipide in der Hefebiomasse. Diese niedrige Lipidkonzentration führt zu einer aufwendigen Produktaufarbeitung. Konzentriert man die Zucker im Hydrolysat auf, beispielsweise durch Wasserentfernung, konzentriert man auch alle anderen Nährstoffe zusätzlich auf. Der niedrige Zuckergehalt in der Restalgenbiomasse, und damit im Mikroalgenhydrolysat, stellt daher ein Problem bei der Lipidproduktion durch oleogene Hefen in bisher eingesetzten Zulaufverfahren dar. Deshalb soll der Einsatz eines

Membranbioreaktors mit totaler Zellrückhaltung für die Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* erarbeitet werden. Durch die Verweilzeitentkopplung zwischen Medium und Zellen können so Fermentationsmedien mit niedrigen Zuckerkonzentrationen genutzt werden. Während Substrate im Medium kontinuierlich in den Membranbioreaktor hinein und verbrauchtes Medium hinaus gepumpt werden können, werden die Zellen, die intrazellulär Lipide einlagern, stets im Reaktor zurückgehalten. Bei niedrig konzentrierten Substraten müssen während eines Prozesses deutlich größere Volumina als beispielsweise bei hochkonzentrierten, synthetischen Zuckerlösungen zugesetzt werden. Dadurch würde bei Zulaufprozessen eine Verdünnung der Zellsuspension erfolgen, die gleichzeitig mit einer Verdünnung der Produktkonzentration und damit einer aufwendigen Produktaufarbeitung einhergeht. Durch die Verweilzeitentkopplung im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung soll dieser nachteilige Verdünnungseffekt umgangen werden.

In der Restalgenbiomasse sind außerdem noch große Mengen organischen Stickstoffs in Form von Protein- und Peptidresten sowie Phosphat und Eisen vorhanden (Richmond und Hu, 2013). Um eine Stickstofflimitierung zur Lipidbildung zu ermöglichen, stellt die Entfernung des organischen Stickstoffs durch Abtrennung der Protein- und Peptidreste mittels Ultrafiltration oder Hitzedenaturierung und anschließender Fällung jedoch einen erheblichen Zeit-, Kosten- und Arbeitsaufwand dar. Zudem kann es dadurch zu einem Verlust von Zuckern kommen (Wu et al., 2010a). Damit fehlt eine effiziente Möglichkeit, um eine Stickstofflimitierung in Mikroalgenhydrolysat zu erreichen, so dass dieses anschließend als Fermentationsmedium zur Lipidproduktion mit oleogenen Hefen eingesetzt werden kann. Als eine einfache, schnelle und günstige Möglichkeit zur Etablierung einer Phosphorlimitierung in Algenhydrolysat soll hierfür die chemische Phosphatfällung mittels Eisensalzen untersucht werden, die zum Beispiel bereits in der Abwasserbehandlung häufig eingesetzt wird (Bever, 1995).

Folgende Arbeitspakete sollen zur Erreichung der oben genannten Ziele dienen:

- Reaktionstechnische Charakterisierung der beiden oleogenen Hefen *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus* hinsichtlich Wachstum und Lipidbildung unter Verwertung von einzelnen Pentosen und Hexosen sowie Zuckergemischen
- Untersuchungen zur Lipidherstellung im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung bei niedrigen Substratkonzentrationen
- Untersuchungen zur chemischen Phosphatfällung als Vorbehandlungsmethode von Algenhydrolysat für dessen Einsatz als Ölhefe-Fermentationsmedium
- Lipidproduktion im Membranbioreaktor mit Algenhydrolysat als Fermentationsmedium

3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden zuerst bioprozesstechnische Grundlagen zur Kultivierung von Mikroorganismen in Rührkesselreaktoren erläutert, während im zweiten Abschnitt auf Membranbioreaktoren eingegangen wird. Im letzten Abschnitt werden die Eigenschaften oleogener Mikroorganismen und Besonderheiten im Lipidstoffwechsel dargestellt.

3.1 Kultivierung von Mikroorganismen in Rührkesselreaktoren

In diesem Abschnitt wird zuerst allgemein auf die Stoffbilanz in einem idealen Rührkesselreaktor, sowie die Kinetik von Wachstum und Produktbildung von Mikroorganismen eingegangen, um später die Besonderheiten der Betriebsweisen von Satzverfahren, Zulaufverfahren und kontinuierlicher Prozessführung mit und ohne Zellrückhaltung zu erläutern.

3.1.1 Stoffbilanz des idealen Rührkesselreaktors

Als Bioreaktor wird „ein abgegrenzter Raum (...) verstanden, in dem in Anwesenheit und unter Mitwirkung eines Biokatalysators eine Stoffumwandlung stattfindet“ (Chmiel, 2011). Am weitesten verbreitet sind hierbei Rührkesselreaktoren mit Scheibenrührern, die für die Durchmischung des Reaktorvolumens, das Suspendieren von Feststoffen, das Emulgieren zweier ineinander nicht löslicher Flüssigkeiten oder das Dispergieren gasförmiger Substrate eingesetzt werden (Chmiel, 2011). Dabei können geschlossene, teiloffene und offene Systeme unterschieden werden.

Als geschlossene Systeme werden Bioreaktoren beschrieben, in denen alle notwendigen Substrate vorgelegt werden und mit der Inokulation der Prozess gestartet wird. In diesem als Satzverfahren (siehe Kapitel 3.1.3) beschriebenen Prozess werden nach Prozessstart lediglich gasförmige Substrate sowie gegebenenfalls geringe Mengen an Titrations- und Antischaummittel zugegeben und Proben zur Analytik entnommen.

Als teiloffene Systeme bezeichnet man Reaktoren, die im Zulaufverfahren (siehe Kapitel 3.1.4) betrieben werden. Zulaufverfahren eignen sich vor allem dann, wenn aufgrund von Substratinhibition oder Toxizität keine hohen Anfangssubstratkonzentrationen in einem Satzverfahren vorgelegt werden können. Zulaufverfahren werden oft bei industriellen Prozessen eingesetzt (Chmiel, 2011), bei denen ein Reaktor zuerst im Satzverfahren betrieben wird und anschließend konzentriertes, frisches Medium zugeführt wird. So können Substratkonzentrationen im Reaktor niedrig gehalten und ein Prozess durch Regelung der Medienzufuhr hinsichtlich Wachstum und Produktbildung gesteuert werden.

Werden Bioreaktoren als offene Systeme betrieben, spricht man auch von einer kontinuierlichen Prozessführung (siehe Kapitel 3.1.5). Diese Systeme sind nicht nur

hinsichtlich gasförmiger Substrate offen, sondern auch in Bezug auf die Flüssigphase. Es wird ständig frisches Medium hinzugeführt und Produktlösung abgezogen, sodass das Arbeitsvolumen im Reaktor konstant bleibt.

Für die Bilanzierung von Prozessen in Rührkesselreaktoren werden als Grenzfall ideale Rührkesselreaktoren betrachtet, in denen räumlich konstante (isotrope) Bedingungen bezüglich der Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, den physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung und der Reaktionsgeschwindigkeiten vorherrschen. Unter der Annahme von isothermen und isobaren Bedingungen und volumenbeständiger Reaktionen lässt sich folgende, allgemeine Stoffbilanz für eine Komponente i aufstellen:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = c_{i,ein} \cdot F_{ein} - c_{i,aus} \cdot F_{aus} + r_i \cdot V \quad (3.1)$$

c_i	Konzentration der Komponente i , g L^{-1}
$c_{i,ein}, c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf- oder Ablaufvolumenstrom, g L^{-1}
F_{ein}, F_{aus}	Zulauf- beziehungsweise Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
V	Reaktionsvolumen, L

3.1.2 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Unter Wachstum versteht man bei einzelligen Mikroorganismen, die sich durch Zellteilung vermehren, die Zunahme der Zellzahl, welche oft gleichzusetzen ist mit der Zunahme der Masse. Zur Definition wichtiger Parameter für Wachstum und Produktbildung werden die Zellen im Bioreaktor mit einem unstrukturierten und unsegregierten Modell betrachtet. Dies bedeutet, dass die Zellpopulation im Reaktor als eine gleichmäßige Lösung angenommen wird und keine Subpopulationen vorliegen (Chmiel, 2011).

Das Wachstum der Zellen kann über die Wachstumsrate r_x definiert werden, welche die Änderung der Biomassekonzentration c_x über die Zeit t beschreibt. Unter nicht-limitierenden Bedingungen kann die Wachstumsrate mit Gleichung 3.2 dargestellt werden:

$$r_x = \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \quad (3.2)$$

r_x	volumetrische Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
c_x	(lipidfreie) Biomassekonzentration, g L^{-1}
t	Zeit, h
μ	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Damit definiert sich die spezifische Wachstumsrate μ als:

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.3)$$

Formalkinetischer Ansatz nach Monod (1949)

Wird die spezifische Wachstumsrate μ als Funktion eines limitierenden Substrats, in der Regel der Kohlenstoffquelle, beschrieben, kann dies nach Gleichung 3.4 dargestellt werden (Monod, 1949):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.4)$$

μ_{max} maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

c_S Konzentration des Substrats S, $g L^{-1}$

K_S Affinitätskonstante für das Substrat S, $g L^{-1}$

Die Wachstumsrate hängt hierbei ausschließlich von einer limitierenden Substratkonzentration ab, alle nicht berücksichtigten Prozessvariablen wie Temperatur, Druck, pH, andere Substrate und Produkte müssen als konstant angesehen werden. Ist die Substratkonzentration c_S viel größer als K_S kann die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} erreicht werden. K_S ist definiert als die Konzentration, bei der die Wachstumsrate halbmaximal ist. Je kleiner die Affinitätskonstante K_S ist, desto größer ist die Affinität des Mikroorganismus zu diesem Substrat.

Analog zur spezifischen Wachstumsrate μ können die zellspezifische Substrataufnahmerate q_S und die zellspezifische Produktbildungsrate q_P dargestellt werden.

$$q_S = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} = \frac{r_S}{c_X} \quad (3.5)$$

$$q_P = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} = \frac{r_P}{c_X} \quad (3.6)$$

q_S zellspezifische Substrataufnahmerate für das Substrat S, $g g^{-1} h^{-1}$

r_S volumetrische Substrataufnahmerate, $g L^{-1} h^{-1}$

q_P zellspezifische Produktbildungsrate des Produktes P, $g g^{-1} h^{-1}$

c_P Produktkonzentration, $g L^{-1}$

r_P volumetrische Produktbildungsrate, $g L^{-1} h^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate q_S setzt sich hierbei zusammen aus der Substrataufnahmerate für das Zellwachstum $q_{S,\mu}$, der Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel m_S und der Substrataufnahmerate für die Produktbildung $q_{S,P}$.

$$q_S = q_{S,\mu} + m_S + q_{S,P} \quad (3.7)$$

$q_{S,\mu}$ zellspezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$

m_S Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$

$q_{S,P}$ zellspezifische Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$

Verknüpft man Substrataufnahme/Produktbildung und Wachstum lassen sich Biomasseausbeute $Y_{XS,\mu}$ und Produktausbeute Y_{PS} beschreiben:

$$Y_{XS,\mu} = \frac{\text{gebildete Biomasse}}{\text{verbrauchtetes Substrat}} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{r_X}{r_S} \quad (3.8)$$

$$Y_{PS} = \frac{\text{gebildete Produkt}}{\text{verbrauchtetes Substrat}} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{q_P}{q_S} = \frac{r_P}{r_S} \quad (3.9)$$

$Y_{XS,\mu}$ Biomasseausbeute, $g\ g^{-1}$

Y_{PS} Produktausbeute, $g\ g^{-1}$

Handelt es sich bei den gebildeten Produkten um Lipide, so beträgt die maximal mögliche Produktausbeute (Lipidausbeute) aus Glucose aufgrund der Stöchiometrie aus dem Stoffwechsel $0,33\ g\ g^{-1}$ (Moreton et al., 1988; Ratledge und Cohen, 2008). Der Lipidgehalt Y_{LX} von Zellen lässt sich über Gleichung 3.10 beschreiben:

$$Y_{LX} = \frac{\text{gebildete Lipide}}{\text{lipidhaltige Biomasse}} = \frac{m_L}{m_{X+L}} = \frac{dc_L}{dc_{X+L}} \quad (3.10)$$

Y_{LX} Lipidgehalt, $g\ g^{-1}$

m_L Masse Lipide, g

m_{X+L} lipidhaltige Biomasse, g

c_L Lipidkonzentration, $g\ L^{-1}$

c_{X+L} Konzentration der lipidhaltigen Biomasse, $g\ L^{-1}$

Unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels muss Gleichung 3.4 um die Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel m_S und um den Koeffizienten für die Biomasseausbeute $Y_{XS,\mu}$ erweitert werden.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \quad (3.10)$$

3.1.3 Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor

Wie unter 3.1.1 beschrieben, werden beim Satzverfahren abgesehen von vernachlässigbar geringen Mengen Titrations- und Antischaummittel keine Flüssigkeiten dem System zugeführt, weshalb das Reaktorvolumen konstant bleibt. Daher vereinfacht sich Gleichung 3.1 zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.11)$$

Durch Kopplung von Stoffbilanz und Formalkinetik erhält man Gleichung 3.12 und 3.13, die die zeitlichen Verläufe für die Zellkonzentration c_X und die Substratkonzentration c_S im Satzverfahren beschreiben:

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X = \left(\mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \right) \cdot c_X \quad (3.12)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S \right) \cdot c_X \quad (3.13)$$

Das Wachstum von Mikroorganismen in geschlossenen Systemen gliedert sich dabei in charakteristische Wachstumsphasen (siehe Abbildung 3.1). Nach Inokulation des Reaktionsmediums befinden sich die Zellen in einer Adaption- oder *lag*-Phase (1), in der sie sich an die neuen Reaktionsbedingungen anpassen und noch nicht wachsen. In der anschließenden Übergangsphase (2) beginnen die Zellen mit dem Wachstum, welches in der exponentiellen Wachstumsphase (3) maximal wird. Alle für das Wachstum relevanten Komponenten liegen in dieser Phase im Überschuss vor. In der Substratlimitierungsphase (4) wird das Wachstum der Zellen durch den Verbrauch eines oder mehrerer Substrate gedrosselt. In der stationären Phase (5) liegt ein Gleichgewicht zwischen Wachstumsrate und Absterberate vor und die Biomassekonzentration erreicht ihr Maximum, bevor diese durch Absterben der Zellen in der Absterbephase (6) wieder abnimmt (Doran, 1997).

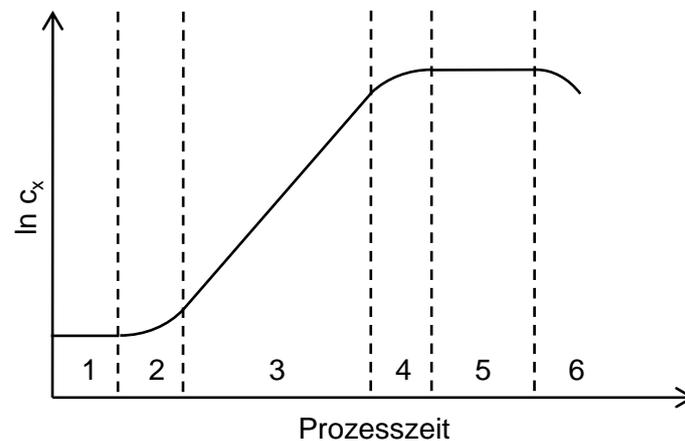


Abbildung 3.1: Wachstum von Mikroorganismen in geschlossenen Reaktionssystemen

Nach einer anfänglichen Adaption- oder *lag*-Phase (1) beginnen die Zellen in der Übergangsphase (2) leicht zu wachsen und erreichen in der exponentiellen Wachstumsphase (3) ihre maximale Wachstumsrate. In der Substratlimitierungsphase (4) wird das Wachstum durch Limitierung eines Substrats geringer. In der stationären Phase (5) stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Absterben ein, bevor in der Absterbephase (6) die Biomassekonzentration c_X wieder abnimmt.

Sauerstoffeintrag

In aeroben Prozessen stellt Sauerstoff ein weiteres Substrat dar, sodass die Gleichungen für die spezifische Substrataufnahmerate (Gleichung 3.5) und den Ertragskoeffizienten

(Gleichung 3.8) auch hier gelten. Die Stoffbilanz für den Gelöstsauerstoff definiert sich in einer Satzkultur als Gleichung 3.14:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{XO_2}} \cdot c_X \quad (3.14)$$

OTR	Sauerstoffeintragsrate (<i>oxygen transfer rate</i>), g L ⁻¹ h ⁻¹
OUR	Sauerstoffaufnahme rate (<i>oxygen uptake rate</i>), g L ⁻¹ h ⁻¹
k _L a	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, s ⁻¹
c* _{O₂}	Sättigungskonzentration für Sauerstoff im Medium, g L ⁻¹
c _{O₂}	Sauerstoffkonzentration im Medium, g L ⁻¹
Y _{XO₂}	Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff, g g ⁻¹

Bleibt die Sauerstoffkonzentration im Medium konstant, entspricht der Sauerstoffeintrag (OTR) dem Sauerstoffverbrauch der Zellen (OUR). Die Sauerstoffaufnahme rate kann über Messung des Sauerstoffs in der Zuluft und im Abgas mit Gleichung 3.15 bilanziert werden, wobei Zu- und Abluftstrom als gleich angenommen werden (Chmiel, 2011; Schügerl und Bellgardt, 1992):

$$OUR = \frac{\dot{F}_{Gas,ein} \cdot (\gamma_{O_2,ein} - \gamma_{O_2,aus})}{V_R \cdot V_M} \quad (3.15)$$

F _{Gas,ein}	Zuluftstrom in den Reaktor, L h ⁻¹
γ _{O₂,ein}	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs in der Zuluft, % (20,95 % bei Begasung mit Luft)
γ _{O₂,aus}	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs in der Abluft, %
V _R	Reaktorvolumen, L
V _M	Molvolumen idealer Gase, L mol ⁻¹ (22,414 L mol ⁻¹)

Analog kann die Kohlenstoffdioxidbildungsrate (*carbon dioxide evolution rate*, CER) für das bei aeroben Prozessen gebildete, gasförmige Produkt Kohlenstoffdioxid als Gleichung 3.16 dargestellt werden:

$$CER = \frac{\dot{F}_{Gas,ein} \cdot (\gamma_{CO_2,ein} - \gamma_{CO_2,aus})}{V_R \cdot V_M} \quad (3.16)$$

CER	Kohlendioxidbildungsrate (<i>carbon dioxide evolution rate</i>), g L ⁻¹ h ⁻¹
γ _{O₂,ein}	Stoffmengenanteil des Kohlenstoffdioxids in der Zuluft, % (0,04 % bei Begasung mit Luft)
γ _{O₂,aus}	Stoffmengenanteil des Kohlenstoffdioxids in der Abluft, %

Der so genannte Respirationsquotient (RQ) wird aus dem molaren Verhältnis von Kohlenstoffdioxidbildungsrate zu Sauerstoffaufnahme gebildet und gibt Auskunft über die metabolische Aktivität von Zellen (Duarte et al., 2004):

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (3.17)$$

RQ Respirationsquotient, mol mol⁻¹

Über die volumetrische Produktivität, auch Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) genannt, lässt sich die Effizienz eines Produktionsprozesses beschreiben:

$$RZA = \frac{m_L}{\Delta t \cdot V_R} = \frac{c_L}{\Delta t} \quad (3.18)$$

RZA Raum-Zeit-Ausbeute oder volumetrische Produktivität, g L⁻¹ h⁻¹

3.1.4 Zulaufverfahren im idealen Rührkesselreaktor

Da beim Zulaufverfahren im idealen Rührkesselreaktor das Volumen nicht konstant gehalten wird, sondern zunimmt, wird die allgemeine Stoffbilanz zu Gleichung 3.19:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = c_{i,ein} \cdot F_{ein} + r_i \cdot V \quad (3.19)$$

Durch Kopplung von Stoffbilanz und Formalkinetik erhält man Gleichung 3.20 und 3.21, die die zeitlichen Verläufe für Zellkonzentration c_X und Substratkonzentration c_S im Zulaufverfahren beschreiben:

$$V \cdot \frac{dc_X}{dt} = -c_X \cdot F_{ein} + \left(\mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \right) \cdot c_X \cdot V \quad (3.20)$$

$$V \cdot \frac{dc_S}{dt} = (c_{S,ein} - c_S) \cdot F_{ein} - \left(\frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S \right) \cdot c_X \cdot V \quad (3.21)$$

Die Berechnung der Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidbildungsrate kann weiterhin mit den Gleichung 3.15 und 3.16 erfolgen, wenn das Reaktorvolumen zum jeweiligen Zeitpunkt bekannt ist.

3.1.5 Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor

Der kontinuierliche Betrieb eines idealen Rührkesselreaktors beschreibt den stetigen Zulauf von frischem Medium und Ablauf von verbrauchtem Medium oder Produktlösung (Antranikian, 2006; Chmiel, 2011). Geht man von einer idealen Durchmischung im Reaktor aus, bedeutet dies, dass die Zusammensetzung des Ablaufstroms gleichzusetzen ist mit der Zusammensetzung im Reaktor ($c_i = c_{i,aus}$). Gleichzeitig werden Zulauf- und Ablaufvolumenstrom identisch eingestellt ($F = F_{ein} = F_{aus}$), um das Reaktorvolumen konstant zu halten. Dadurch stellen sich nach einer gewissen Zeit konstante Werte für alle Prozessparameter ein, was auch als Fließgleichgewicht (*steady state*) bezeichnet wird

(Chmiel, 2011). Damit wird die Stoffbilanz bei der kontinuierlichen Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor im Fließgleichgewicht zu Gleichung 3.22:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = 0 = c_{i, \text{ein}} \cdot F_{\text{ein}} - c_{i, \text{aus}} \cdot F_{\text{aus}} + r_i \cdot V \quad (3.22)$$

Der auf das Arbeitsvolumen bezogene Volumenstrom heißt Verdünnungsrate oder Durchflussrate (*dilution rate*, D) und definiert sich als:

$$D = \frac{F}{V} \quad (3.23)$$

D Verdünnungsrate oder Durchflussrate (*dilution rate*), h^{-1}

F Volumenstrom, L h^{-1}

Die Verdünnungsrate gibt an, wie oft das Volumen im Mittel pro Zeit durch frisches Medium ersetzt wird. Der Kehrwert entspricht der mittleren hydraulischen Verweilzeit τ :

$$\tau = \frac{V}{F} = \frac{1}{D} \quad (3.24)$$

τ mittlere hydraulische Verweilzeit, h

Hierdurch lässt sich die Massenbilanz im Fließgleichgewicht vereinfachen zu:

$$r_i = D \cdot (c_{i, \text{aus}} - c_{i, \text{ein}}) \quad (3.25)$$

Unter der Annahme, dass das Medium steril ist und damit $c_{X, \text{ein}} = 0$ gilt, stellt Gleichung 3.26 die volumetrische Biomassebildung r_X dar und gleichzeitig ergibt sich für die spezifische Wachstumsrate Gleichung 3.27:

$$r_X = D \cdot c_X \quad (3.26)$$

$$\mu \cdot c_X = D \cdot c_X \quad (3.27)$$

$$\text{oder} \quad \mu = D$$

Hieraus ergibt sich der Vorteil, dass mittels der Verdünnungsrate D die Wachstumsrate μ eingestellt werden kann, solange $D \ll \mu_{\text{max}}$ ist. Wird D weiter erhöht, sinkt die Biomassekonzentration ab einer kritischen Verdünnungsrate bis auf null ab, was auch als Auswaschpunkt bezeichnet wird (Antranikian, 2006).

Die volumetrische Substrataufnahmerate r_S lässt sich ebenfalls aus Gleichung 3.25 ableiten:

$$r_S = D \cdot (c_{S, \text{aus}} - c_{S, \text{ein}}) \quad (3.28)$$

Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) wird definiert als Gleichung 3.29:

$$RZA = D \cdot c_P \quad (3.29)$$

c_P Produktkonzentration, g L^{-1}

Neben dem genannten Vorteil der kontinuierlichen Prozessführung eignet sich ein kontinuierlich betriebener idealer Rührkesselreaktor gut zur Bestimmung kinetischer

Parameter (Chmiel, 2011). Nachteile sind jedoch zum einen der erhöhte Installationsaufwand, welcher mit mehr Kosten einhergeht, zum anderen besteht aufgrund der längeren Prozesszeit ein erhöhtes Kontaminationsrisiko. Des Weiteren werden meist nur geringe Biomassekonzentrationen erreicht (Antranikian, 2006).

3.1.6 Prozessführung im idealen Membranbioreaktor

Um das Problem der geringen Biomassekonzentration im kontinuierlich betriebenen, idealen Rührkesselreaktor zu umgehen, eignet sich der Einsatz eines Membranbioreaktors. Dieser wird als kontinuierlicher Prozess mit Zellrückhaltung betrieben, was zu einer Verweilzeit-entkopplung von Medium/Flüssigkeit und Zellen führt. In Membranbioreaktoren ist die Verdünnungsrate D nicht mehr durch die spezifische Wachstumsrate μ begrenzt, sodass höhere Verdünnungsraten und damit höhere Volumenströme eingesetzt werden können. Dadurch kann die volumetrische Produktivität oder Raum-Zeit-Ausbeute gesteigert werden (Antranikian, 2006). Zudem kann ein Auswaschen der Zellen umgangen werden.

Die eingesetzte Filtermembran wird häufig extern in einem Bypass betrieben (siehe 3.2). Dafür wird die Zellsuspension aus dem Reaktor über ein Membranmodul gepumpt. Als Retentatvolumenstrom F_R wird die aufkonzentrierte Zellsuspension zurück in den Reaktor geführt, während der Permeatvolumenstrom F_P als gefiltertes Medium separat abgeführt wird und nicht in den Reaktor zurück gelangt. Wird zusätzlich zum Permeat Zellsuspension abgeführt, wird dies auch als *Bleed*-Strom F_B bezeichnet. Dadurch werden Medienbestandteile wie das Substrat zwar gleichermaßen ausgetragen, jedoch wird die Biomasse nicht identisch ausgetragen. Um dies zu berücksichtigen, wird zusätzlich das Rücklauf- oder Rezirkulationsverhältnis R eingeführt:

$$F_{ein} = F_B + F_P = F_{aus} \quad (3.30)$$

$$R = \frac{F_P}{F_{ein}} \quad (3.31)$$

$R = 0$ entspricht einem kontinuierlich betriebenen, idealen Rührkesselreaktor, während $R = 1$ bedeutet, dass eine totale Zellrückhaltung stattfindet. Wenn die gewählte Filtermembran nicht selektiv für das Substrat ist, bleibt die Substratbilanz des kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors (Gleichung 3.27) weiterhin bestehen (Chmiel, 2011).

3.2 Membranbioreaktoren

In diesem Abschnitt wird auf den Einsatz und die verschiedenen Arten von Membranbioreaktoren sowie die Methode der Querstromfiltration eingegangen.

3.2.1 Einsatz und Arten von Membranbioreaktoren

Der Einsatz von Membranen in Bioreaktoren erfolgt in verschiedenen Bereichen. Grundsätzlich wird sich hierbei des Prinzips bedient, in Flüssigkeiten verschiedene Stoffe

physikalisch nach ihrer Größe zu trennen (Flüssig-Flüssig-Filtration) (Melin und Rautenbach, 2013). Die treibende Kraft für den Trennprozess beruht dabei entweder auf einem Druckgradienten (Konvektion) oder einem Konzentrationsgradienten (Diffusion), wobei meist ersteres eingesetzt wird (Carstensen et al., 2012). Bei Konvektion kann entweder auf der Zulaufseite ein Überdruck oder auf der Permeatseite ein Unterdruck angelegt werden, wodurch eine transmembrane Druckdifferenz beziehungsweise der Transmembrandruck (*trans membrane pressure*, TMP) entsteht.

Generell unterscheidet man drei Filtrationsmodi: Separierung intern im Reaktor (Einsatz von getauchten Membranen), Separierung außerhalb des Reaktors über einen externen Bypass mittels Querstromfiltration oder Betrieb des Membranfilters in einem *dead-end*-Modus (siehe Abbildung 3.2). Während beim Betrieb im *dead-end*-Modus schnell eine starke Deckschichtbildung (*Fouling*) stattfindet, kann dies beim Einsatz von internen und externen Membranmodulen verzögert beziehungsweise komplett verhindert werden (Carstensen et al., 2012; Pinnekamp und Friedrich, 2006). Tabelle 3.1 zeigt weitere Vor- und Nachteile von intern und extern betriebenen Membranmodulen.

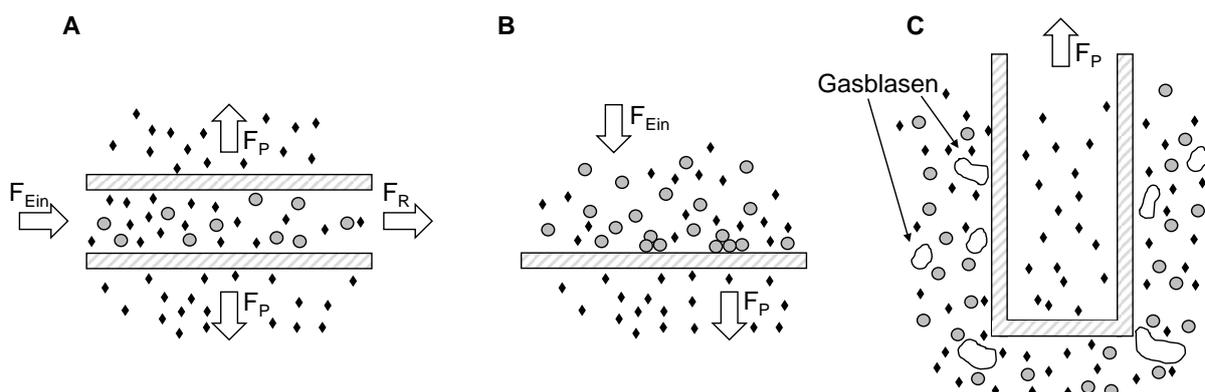


Abbildung 3.2: Drei unterschiedliche Filtrationsmodi: **A)** Querstromfiltration in einer Hohlfaser. Der Eingangsvolumenstrom F_{ein} ist parallel zur Membran und enthält Zellen (\odot), die nicht über die Membran gelangen und im Retentat (F_{R}) verbleiben, sowie niedermolekulare Substanzen (\blacklozenge), die die Membran passieren und über das Permeat (F_{P}) ausgeschieden werden. **B)** *dead-end*-Filtration. Durch den senkrecht auf die Membran treffenden Eingangsvolumenstrom findet eine Deckschichtbildung statt. **C)** Getauchte Hohlfasermembran in einem Bioreaktor. Das Permeat wird über eine externe Pumpe abgeführt. Deckschichtbildung an der Hohlfaser wird durch turbulente Strömung und Begasung im Bioreaktor vermieden. Modifiziert nach Melin und Rautenbach (2013).

Tabelle 3.1: Vor- und Nachteile von internen und externen Membranmodulen (Carstensen et al., 2012).

Charakteristika	Internes Membranmodul	Externes Membranmodul
Vermeidung von Scherstress	+	+/-
Ausreichende O ₂ -Versorgung	+	-
Konstante Betriebsbedingungen	+	-
Keine Zusatzkosten	+	-
Geringer Energieverbrauch	+	-
<i>In situ</i> Sterilisierbarkeit	+	-
Kontaminationsrisiko	-	+
Auftreten von <i>Fouling</i>	+	+/-
Gegenmaßnahmen zu <i>Fouling</i>	-	+
Austauschmöglichkeit	-	+
Skalierbarkeit	-	+

Großtechnisch werden Membranbioreaktoren häufig in der Abwasserreinigung eingesetzt (Meng et al., 2009; Pinnekamp und Friedrich, 2006). Dabei wird zum Beispiel der letzte Prozessschritt im Belebtschlammverfahren, üblicherweise eine Sedimentation, durch einen Filtrationsschritt ersetzt (Judd, 2008; Santos et al., 2011). Auch bei der biologischen Phosphorelimination werden in der Abwasserreinigung Membranbioreaktoren angewendet (Gnirss et al., 2003).

Im Allgemeinen werden Membranreaktoren häufig für den *in situ* Abzug von Produkten (*in situ product removal*, ISPR) eingesetzt. ISPR bietet sich zum einen für gewünschte Produkte an, die außerhalb der Zelle vorliegen beziehungsweise aus der Zelle ausgeschleust werden oder wegen Instabilität des Produkts schnell zur Aufarbeitung abgezogen werden sollen. Zum anderen wird ISPR auch eingesetzt, wenn Stoffwechselprodukte inhibierend auf die Zellen wirken oder Produkte ungewünschte Nebenreaktionen eingehen (Freeman et al., 1993).

Bei der Kultivierung von Säugetierzellen kommen so genannte Perfusionskulturen zum Einsatz, bei denen toxische Stoffe oder gewünschte Produkte aus dem Medium filtriert und gleichzeitig die Zellen mit frischem Medium versorgt werden (Carstensen et al., 2012). So wurden in Perfusionskulturen, die mit getauchten keramischen Membran ausgestattet waren, erfolgreich monoklonale Antikörper mit Hybridoma-Zellen (Dong et al., 2008) und CHO-Zellen (Hufford et al., 2007) produziert.

Für Membranbioreaktoren, in denen getauchte Membranen zur Rückhaltung ganzer Zellen eingesetzt werden, sind diverse Prozesse publiziert. Für die Ethanolproduktion durch *Saccharomyces cerevisiae* beschreiben Chang et al. (1993) den Einsatz eines getauchten Filters aus Edelstahl mit einer Porengröße von 2 (und 10) µm bei einer Verdünnungsrate von 0,55 h⁻¹. Bei Zellkonzentrationen bis zu 150 g L⁻¹ erzielten sie eine durchschnittliche

Ethanolkonzentration von $47,4 \text{ g L}^{-1}$ in 43 h. Durch den Einsatz eines keramischen Filtermoduls konnten Park et al. (1999) über einen Zeitraum von zwei Monaten mit *Saccharomyces cerevisiae* durchschnittlich 43 g L^{-1} Ethanol produzieren. Auch die Hefe *Pichia pastoris* wurde in Schüttelkolben mit getauchten Membranen zur Produktion von β -Galactosidase eingesetzt (Ohashi et al., 1998). Ebenso wurden getauchte Membranen für die Citratproduktion mit dem Pilz *Aspergillus niger* verwendet. Hierbei berichten Daniel und Brauer (1994) eine Produktkonzentration von $80 - 160 \text{ g L}^{-1}$, die sie in zwei Monaten erreichen konnten. Wiczorek und Brauer (1998) nennen sogar eine Citratkonzentration von $88 - 170 \text{ g L}^{-1}$, die sie in 24 Tagen erzielten. Der Einsatz eines getauchten Membranmoduls eignet sich auch zur anaeroben Produktion von Essigsäure aus CO_2 und H_2 . So erzielten Kantzow et al. (2015) eine Raum-Zeit-Ausbeute von $148 \text{ g}_{\text{Acetat}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Acetobacterium woodii* mit Zellrückhaltung durch ein getauchtes Hohlfasermembranmodul.

Membranbioreaktoren, in denen die Membran(en) extern in einem Bypass betrieben werden, eignen sich ebenfalls zum Einsatz mit diversen Mikroorganismen, die verschiedenste extrazelluläre Produkte synthetisieren. So nutzen Cantarella et al. (1998) zum Beispiel *Bifidobacterium imperialis* zur Acrylamidproduktion in einem Ultrafiltrationsmembranbioreaktor. Mit der Hefe *Candida utilis* wurde in einem Membranbioreaktor mit einem keramischen Mikrofilter in einem externen Bypass Phenylacetylcarbinol produziert (Liew et al., 1995), während *Saccharomyces cerevisiae* SL100 zur kontinuierlichen Produktion von durchschnittlich 81 g L^{-1} Ethanol in einem Membranbioreaktor eingesetzt wurde (Melzoch et al., 1991).

Eine besondere Form von Membranbioreaktoren stellen so genannte Enzymmembranreaktoren dar. Dort werden nicht Zellen durch eine Membran zurückgehalten, sondern Enzyme, die eine bestimmte Reaktion katalysieren und dabei ein gewünschtes Produkt herstellen. Dieses Produkt kann in Enzymmembranreaktoren dann über ISPR direkt abgezogen werden, während stetig neues Substrat hinzugeführt wird (Carstensen et al., 2012; Hang et al., 2015; Sitanggang et al., 2016). Eine Erweiterung des Prinzips stellen Kaskadenreaktoren dar, in denen zum Beispiel in einem ersten Enzymmembranreaktor das erste Produkt hergestellt wird. Dieses wird über eine Membran in einen zweiten Enzymmembranreaktor geführt und wird dort für eine andere Reaktion als Substrat verwendet, während das erste Enzym zurück gehalten wird (Jandel et al., 1982; Linko et al., 2015).

3.2.2 Querstromfiltration

Die Querstromfiltration, welche auch *Tangential-Flow-Filtration* oder *Cross-Flow-Filtration* genannt wird, ist eine spezielle Methode zum Filtrieren von Flüssigkeiten. Die Besonderheit der Querstromfiltration liegt darin, dass die zu filtrierende Flüssigkeit parallel zur Filtermembran gepumpt wird, während das Permeat senkrecht zur Filtermembran abgezogen

wird (siehe Abbildung 3.2 B). Dadurch können höhere Überströmungsgeschwindigkeiten erreicht werden und somit einer Deckschichtbildung auf dem Filter entgegen gewirkt werden. Bildet sich dennoch eine Deckschicht auf der Membran aus, werden deren Partikel im Idealfall durch die Scherkräfte der überströmenden Suspension zurück in die Kernströmung geführt (Melin und Rautenbach, 2013).

Als Filtermembranen werden bei der Querstromfiltration meist Hohlfasermembranen (Hohlfasermodule) oder Filterplatten eingesetzt. Hohlfasermodule zeichnen sich durch eine höhere Packungsdichte als Filterplatten aus und besitzen eine hohe Eigenstabilität durch die Fasern. In der Regel ist die Herstellung von Hohlfasern relativ günstig; meist werden hydrophile Materialien wie Polyethersulfon (PES), Polysulfone (PS) oder auf Cellulose basierende Materialien wie Hydrosart® verwendet (Produktblatt GE Healthcare and Life Sciences, Produktblatt Sartorius AG). In Hohlfasermodulen werden mehrere einzelne Hohlfasern zusammengefasst und in einer Kartusche verkapselt. Meist werden Hohlfasermodule mit der zu klärenden Suspension in der Innenseite durchströmt, das Permeat wird außenseitig abgezogen. Filterplatten können aus den gleichen Materialien wie Hohlfasermodule bestehen. Hierbei werden Flachmembranen mit Platten und *Spacern* abgestützt, wobei mehrere Filterplatten zu Stapeln zusammengefasst werden können, was eine einfache Erhöhung der Membranfläche ermöglicht (Produktblatt Sartorius AG).

Beide Varianten können in einem Membranbioreaktor zur Zellrückhaltung eingesetzt werden. Hierbei findet die Querstromfiltration außerhalb des Reaktors statt, weshalb zusätzliche Rezirkulationspumpen benötigt werden. Diese stellen nicht nur einen zusätzlichen Kostenfaktor dar, sondern haben in der Regel auch einen hohen Energiebedarf, der deutlich höher liegt als bei der klassischen *dead-end*-Filtration (Melin und Rautenbach, 2013).

Abhängig von der Partikelgröße lassen sich druckgetriebene Membranverfahren wie die Querstromfiltration in Mikrofiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration und Umkehrosmose einteilen (Melin und Rautenbach, 2013; Pinnekamp und Friedrich, 2006) (siehe Abbildung 3.3). In dieser Arbeit wird ein Hohlfasermodule zur Ultrafiltration eingesetzt.

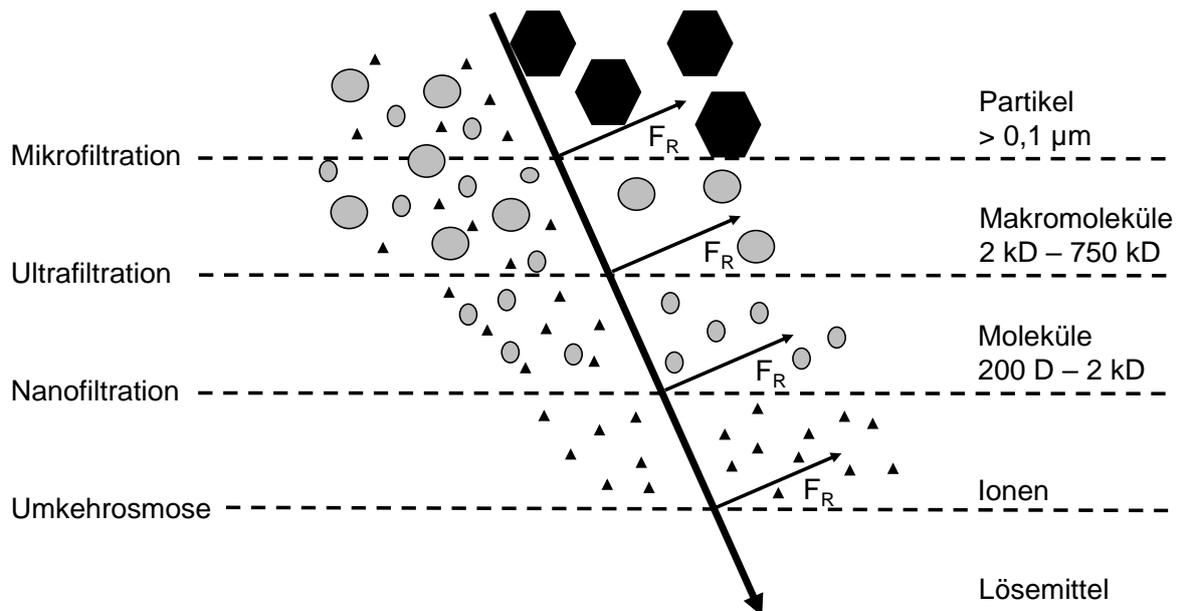


Abbildung 3.3: Unterteilung von druckgetriebenen Membranverfahren nach Partikelgröße. Je nach eingesetzter Filtration werden verschiedene Partikel von der Membran im Retentatvolumenstrom (F_R) zurück gehalten.

3.3 Oleogene Mikroorganismen

Jeder Mikroorganismus produziert Lipide, die zum Beispiel als Struktur lipide wie Phospholipide Zellmembranen darstellen. Als oleogene, das heißt ölbildende, Mikroorganismen werden jedoch Mikroben bezeichnet, welche mehr als 20 % ihrer Biomasse in Form von Lipiden einlagern können (Ageitos et al., 2011; Beopoulos et al., 2011; Wynn und Ratledge, 2005). Analog zu dem Begriff *single cell protein* werden diese mikrobiellen Öle als *single cell oil (SCO)* bezeichnet (Moreton et al., 1988; Ratledge, 1982).

3.3.1 Eigenschaften oleogener Mikroorganismen

Es gibt sowohl bei Bakterien, Mikroalgen, Pilzen wie auch bei Hefen Vertreter von oleogenen Spezies. Jedoch gibt es in der Natur deutlich mehr nicht oleogene Vertreter als oleogene Spezies; so besitzen nur etwa 25 - 30 der um die 600 bekannten Hefespezies oleogene Eigenschaften (Ageitos et al., 2011; Ratledge, 2008; Wynn und Ratledge, 2005). Was alle oleogenen Mikroorganismen vereint, ist die Eigenschaft, unter bestimmten Umweltbedingungen wie Stickstoffmangel vermehrt Lipide in Form von Triglyceriden als Speicherstoffe einzulagern. Diese können bis zu 80 % ihrer Biotrockenmasse ausmachen (Huerlimann et al., 2010; J. Zhang et al., 2011) und werden als Lipidtropfen (*lipid bodies*) in den Zellen eingelagert (siehe Abbildung 3.4). Häufig wird hier von dem Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, kurz C/N-Verhältnis gesprochen, was das Massen- oder Stoffmengenverhältnis des Kohlenstoffs aus der Kohlenhydratquelle zum limitierenden Nährstoff, hier Stickstoff, beschreibt. Typische Werte aus der Literatur liegen hier bei

100 - 165 mol mol⁻¹ (Ageitos et al., 2011; Huang et al., 2012) beziehungsweise 11 - 50 g g⁻¹ (Hassan et al., 1996; Ykema et al., 1989). Analog dazu spricht man bei anderen Nährstofflimitierungen zum Beispiel vom C/P-Verhältnis (Phosphor) oder C/S-Verhältnis (Schwefel). Ändern sich die Umweltbedingungen für die Mikroorganismen wieder, sodass keine Nährstofflimitierung mehr vorliegt, werden die Speicherlipide von den Mikroben wieder abgebaut (Holdsworth und Ratledge, 1988; Papanikolaou und Aggelis, 2011; Rattray et al., 1975).

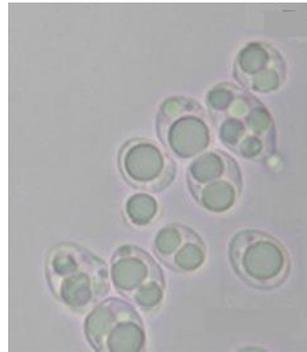


Abbildung 3.4: Zellen der oleogenen Hefe *Cryptococcus curvatus* O3 unter dem Lichtmikroskop. Deutlich erkennbar sind die gebildeten Lipide, die in Form von Lipidtropfen gespeichert werden (J. Zhang et al., 2011).

3.3.2 Der Lipidstoffwechsel oleogener Hefen

Der Lipidstoffwechsel oleogener Hefen unterscheidet sich im Allgemeinen nicht stark von der Lipidbiosynthese konventioneller Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Ageitos et al., 2011; Ratledge und Wynn, 2002). Generell erfolgt eine Lipidakkumulation nur, wenn die Kohlenstoffquelle im Überfluss vorhanden ist und gleichzeitig ein weiterer Schlüsselnährstoff wie zum Beispiel Stickstoff limitiert ist (Ageitos et al., 2011; Beopoulos et al., 2011; Ratledge, 1982). Jedoch weisen oleogene Hefen Besonderheiten in ihrem Lipidstoffwechsel auf, indem der Kohlenstoff einer im Überschuss vorhandene Kohlenstoffquelle verstärkt zur Synthese von Lipiden genützt wird (Ratledge und Wynn, 2002; Ratledge, 2004). Es ist bekannt, dass die Lipidakkumulation in oleogenen Mikroorganismen durch beispielsweise die Limitierung der Stickstoffquelle induziert wird. Hierdurch wird eine Kaskade zur Lipidakkumulation ausgelöst (Ratledge, 2004):

- 1 Eine extrazelluläre Stickstofflimitierung führt zur erhöhten Aktivität der Adenosinmonophosphat-Deaminase (AMP: Adenosinmonophosphat), was zu einer Erniedrigung des zellinternen AMP-Spiegels führt.
- 2 Hierdurch wird die strikt AMP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase in den Mitochondrien inhibiert. Somit häuft sich Isocitrat vermehrt an und wird durch die Aconitase in Citrat umgewandelt, wodurch der Citratgehalt im Mitochondrium steigt.
- 3 Das Citrat wird aus den Mitochondrien über die Citrat-Malat-Translokase in das Cytosol transportiert, wo es durch das erste Schlüsselenzym der Lipidakkumulation in

oleogenen Hefen, der **ATP-Citrat-Lyase (ACL)**, in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten wird.

- 4 **Acetyl-CoA** fließt als Vorläufer in die Fettsäuresynthese ein.
- 5 Oxalacetat wird mit der Malat-Dehydrogenase in Malat umgewandelt, welches als Gegenpart für den Citratefflux aus dem Mitochondrium durch die Citrat-Malat-Translokase benötigt wird.
- 6 Das zweite Schlüsselenzym der Lipidakkumulation, das **Malatenzym (ME)**, katalysiert die Umwandlung von Malat zu Pyruvat und CO₂, wobei NADPH aus NADP⁺ gebildet wird. **NADPH** fließt als Vorläufer in die Fettsäuresynthese ein.

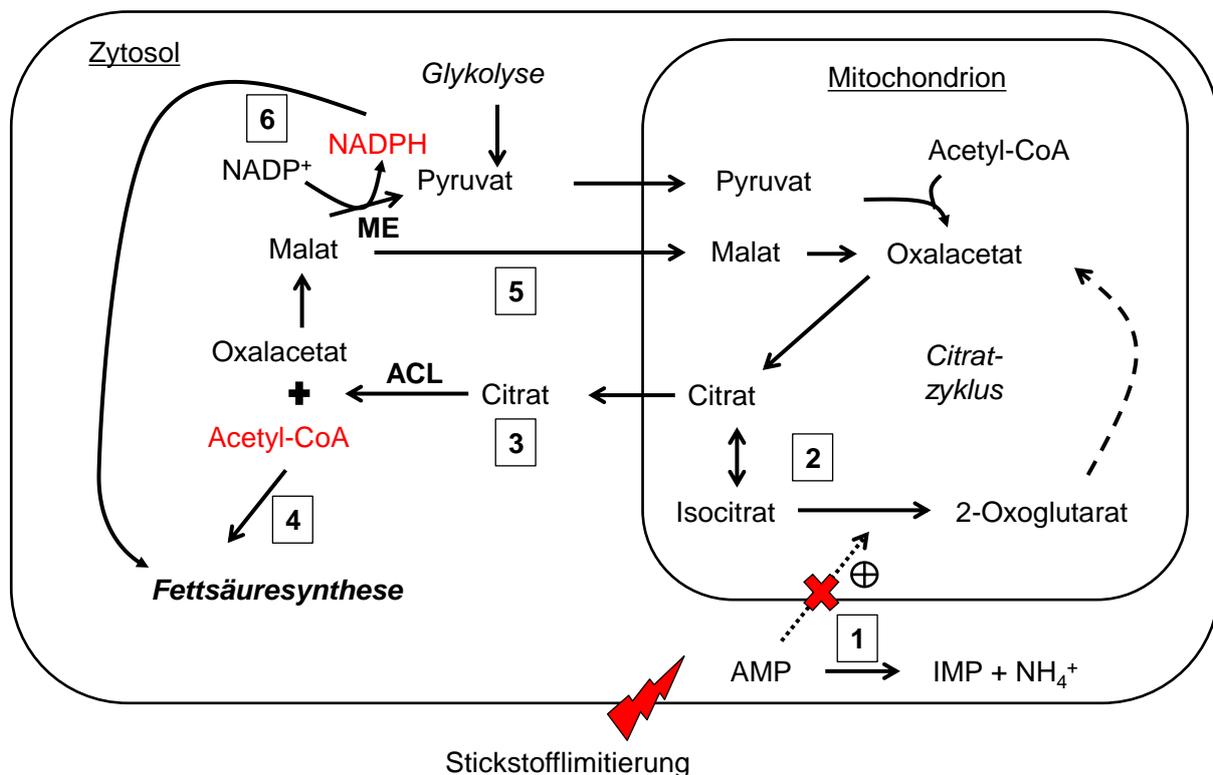


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der biochemischen Ereignisse in oleogenen Hefen, die zur Fettsäuresynthese und Lipidbildung unter Stickstofflimitierung führen.

Unter stickstofflimitierenden Umweltbedingungen wird eine Kaskade (1-6) eingeleitet, die mithilfe der Schlüsselenzyme in oleogenen Mikroorganismen, der ATP-Citrat-Lyase (**ACL**) und dem Malatenzym (**ME**), die wichtigen Vorläufermoleküle **Acetyl-CoA** und **NADPH** für die Fettsäuresynthese darstellt (modifiziert nach Ratledge und Wynn 2002).

Während die **ATP-Citrat-Lyase** nur in oleogenen Mikroorganismen gefunden wird, kommt das **Malatenzym** in vielen Hefen und Pilzen vor. Dennoch kommt dem Malatenzym eine Schlüsselrolle für die Produktion von Speicherlipiden und Triglyceriden in oleogenen Mikroorganismen zu, da die Fettsäuresynthese strikt vom NADPH des Malatenzym abhängig ist (Ratledge und Wynn, 2002). In Abbildung 3.5 ist der Biosyntheseweg für die Vorläufer Acetyl-CoA und NADPH der Fettsäuresynthese in oleogenen Mikroorganismen schematisch dargestellt.

In oleogenen Hefen liegt der Großteil der gespeicherten Lipide als neutrale Fette zum Beispiel in Form von Triglyceriden in so genannten *lipid bodies* vor (Beopoulos et al., 2011). Die Hauptfettsäuren sind Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2) (Davies et al., 1990; Hassan et al., 1996; Papanikolaou und Aggelis, 2002; Sitepu et al., 2013; G. Zhang et al., 2011). Die Triglyceridsynthese erfolgt bei Hefen im endoplasmatischen Reticulum oder direkt in den *lipid bodies* über die konsekutive Acylierung von Glycerin-3-phosphat durch Acyltransferasen und der anschließenden Abspaltung der Phosphatreste durch Phosphatasen. Die maximale theoretische Lipidausbeute in oleogenen Mikroorganismen liegt bei 33 %, das heißt pro 100 g Glucose können maximal 33 g Lipide (in Form von Triglyceriden) gespeichert werden (Moreton et al., 1988; Ratledge und Cohen, 2008).

3.3.3 *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus*

Bei Hefen finden sich hauptsächlich in den Gattungen *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus* und *Trichosporon* oleogene Spezies (Ageitos et al., 2011; Beopoulos et al., 2011). Zwei oleogene Hefespezies, auf die hier kurz eingegangen wird, sind *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus*.

Die Hefe *Trichosporon oleaginosus* wurde ursprünglich von Moon et al. (1978) in der Umgebung eines Milchverarbeitungsbetriebs isoliert und zunächst als *Candida curvata* D bezeichnet. Die Hefe gehört ebenfalls zu den Basidiomyceten und trug in den letzten 35 Jahren auch die Namen *Apiotrichum curvatum* (Davies et al., 1990; Park et al., 1990) und *Cryptococcus curvatus* (Hassan et al., 1996; Meesters et al., 1996), bevor sie 2011 durch DNA-Sequenzvergleich endgültig als *Trichosporon oleaginosus* eingeordnet wurde (Gujjari et al., 2011). Sie zeichnet sich durch ein sehr breites Substratspektrum aus und kann nicht nur viele Monosaccharide (Evans und Ratledge 1983; Heredia und Ratledge 1988), Lactose (Davies, 1988; Moon et al., 1978), Ethanol (Evans und Ratledge, 1983a) und Glycerin (Meesters et al., 1996) zur Lipidbildung nutzen, sondern auch Abfallstoffe der Lebensmittel- und Agrarindustrie (Davies, 1988; Seo et al., 2012; Thiru et al., 2011) sowie N-Acetylglucosamin (Wu et al., 2010b), welches Bestandteil von Krabbenschalen ist. Zudem ist von einem nah verwandten Stamm kürzlich das Genom sequenziert worden (Kourist et al., 2015).

Cryptococcus curvatus gehört zu den Basidiomyceten und ist als Hefe beschrieben, welche neben den Zuckern Glucose (J. Zhang et al., 2011) und Arabinose (Knoshaug et al., 2009), auch Acetat (Christophe et al., 2012) als Substrat akzeptiert und auch Abfallstoffe wie Melasse verwerten kann (Takakuwa und Saito, 2010). In der Literatur sind bereits viele verschiedene Stämme der Spezies *Cryptococcus curvatus* beschrieben. Hefen der Gattung *Cryptococcus* sind weit verbreitet in der Natur und können von vielen Habitaten wie Tieren, Pflanzen oder kompostierendem Holz isoliert werden.

3.3.4 Einsatz und Anwendung von mikrobiellen Ölen

Die ersten Untersuchungen zu ölbildenden Mikroorganismen, und insbesondere zu oleogenen Hefen und Pilzen, wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Hier wurde vor allem in Deutschland während der Weltkriege nach Alternativen zu Pflanzenölen gesucht. So wurden einige Stämme als *Single-Cell-Oil*-Produzenten identifiziert und Kultivierungsbedingungen untersucht (Bernhauer et al., 1948). Da aber noch keine Fermentationsanlagen im technischen Maßstab vorhanden waren und nach Kriegsende mit Wirtschaftsaufschwung und intensiverer Landwirtschaft wieder Pflanzenöle produziert werden konnten, dauerte es bis zu den 1970er Jahren, bis neue Ansätze zur Anwendung von mikrobiellen Ölen aufgegriffen wurden (Ratledge und Wynn, 2002; Wynn und Ratledge, 2005). Zu nennen sind hier vor allem die Kultivierung von oleogenen Hefen zur Produktion von Nahrungsergänzungsmitteln wie mehrfachungesättigte Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acids*, PUFAs) (Davies, 1988) und Kakaobutteräquivalenten (Hassan et al., 1995). PUFAs wie Arachidonsäure (C20:4 n-6) und Docosahexansäure (C22:6 n-3) spielen hierbei eine Rolle als Zusätze in Nahrung für Säuglinge, Babys oder Schwangere. Diese PUFAs sind auch in Fischfetten enthalten, bergen hier aber das Risiko der zusätzlichen Aufnahme von Schwermetallen wie Quecksilber, welches sich ebenfalls in Fischen anreichert. Industriell, jedoch nicht unbedingt ökonomisch, wurden PUFAs zum Beispiel in Neuseeland mit Abfallströmen aus Molkereibetrieben (Molkenpermeat) hergestellt (Davies, 1988). Auch Unternehmen wie DSM², Martek Biosciences Corporation³ oder Evonik⁴ produzieren mit oleogenen Mikroorganismen PUFAs als Nahrungsergänzungsmittel oder Futtermittel. Entsprechende Patente (zum Beispiel US 20130143305 A1, US 8313911 B2) zur PUFA-Produktion mit oleogenen Hefen existieren ebenfalls.

Eine weitere Anwendung von mikrobiellen Ölen ist der Einsatz als Biodiesel und Biokraftstoff der zweiten Generation (Enshaeieh et al., 2012; Galafassi et al., 2012; Li et al., 2008; Liu und Zhao, 2007; Sankh et al., 2012; Thiru et al., 2011). Die finnische Firma Neste Oil plant die Verwendung eines Prozesses zur Produktion von mikrobiellen Ölen mit oleogenen Hefen und Pilzen, in dem mit Abfallprodukten aus der Landwirtschaft als Substrat gearbeitet werden soll⁵. Daraus wird der Biokraftstoff NExBTL hergestellt, der als Biodiesel oder Biokerosin verkauft wird. Dies ist vor allem möglich, da die Fettsäurezusammensetzung von SCO aus oleogenen Hefen ähnlich ist wie die Zusammensetzung von bestimmten Pflanzenölen, die bereits für die Synthese von Biotreibstoff (vor allem Biodiesel) eingesetzt werden (siehe Tabelle 3.2).

² <http://www.dsm.com/corporate/science/competences/nutritional-sciences.html>

³ <https://www.sba.gov/sba-100/martek-biosciences-corporation>

⁴ persönliche Kommunikation

⁵ <https://www.neste.com/en/waste-based-microbial-oil-set-become-raw-material-renewable-diesel>

Tabelle 3.2: Übersicht über die Fettsäurezusammensetzung von Ölen verschiedener Hefen*, Pflanzen und Algen. (n.a. = nicht angegeben; Myristinsäure (C14:0); Palmitinsäure (C16:0); Stearinsäure (C18:0); Ölsäure (C18:1); Linolsäure (C18:2); Linolensäure (C18:3))

Typ des Öls / Spezies	Hauptsächlich vorkommende Fettsäuren, % (w/w)						Quelle
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
<i>Trichosporon oleaginosus</i> *	-	32	15	44	8	n.a.	(Moon et al., 1978)
<i>Rhodotorula glutinis</i> *	n.a.	19,0	14,9	44,5	12,0	5,0	(G. Zhang et al., 2011)
<i>Lipomyces starkeyi</i> *	0,5	36,5	5,4	52,8	1,2	n.a.	(Lin et al., 2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i> *	n.a.	15,0	13,0	47,0	21,0	n.a.	(Papanikolaou und Aggelis, 2002)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4*	1,3	20,0	14,6	46,9	13,1	3,5	(Li et al., 2007)
Algenöl (<i>Nannochloropsis salina</i>)	-	37,5	0,9	11,9	1,5	-	(Huerlimann et al., 2010)
Rapsöl	0,2	2,5-7,0	0,8-3,0	51,0- 70,0	15,0- 30,0	5,0- 14,0	Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft ¹
Sojaöl	0,2	8,0- 13,5	2,0-5,4	17,0- 30,0	48,0- 59,0	4,5- 11,0	
Palmöl	0,5-2,0	39,9- 47,5	3,5-6,0	36,0- 44,0	9,0- 12,0	0,5	

¹ siehe dazu <http://www.dgfett.de/material/fszus.php>

4 Material und Methoden

4.1 Hefestämme

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hefestämme untersucht. *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Der Stamm *Cryptococcus curvatus* CBS 5324 wurde von Prof. Thomas Brück (Professur für Industrielle Biokatalyse, TUM) zur Verfügung gestellt und wurde ursprünglich vom *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Niederlande) bezogen.

4.2 Medien, Puffer und Lösungen

Vorkulturmedium

Für die Herstellung der Vorkulturen wurde als Komplexmedium das YPD-Medium (*yeast extract peptone dextrose*-Medium; siehe Tabelle 4.1) verwendet. Pepton und Hefeextrakt wurden hierfür einzeln eingewogen, in voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst und der pH auf 5,5 eingestellt. Anschließend wurde das YPD-Medium bei 121 °C für 20 min autoklaviert und nach Abkühlen die separat hergestellte Glucosestammlösung (500 g L⁻¹) in entsprechender Menge steril zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Für die Herstellung von YPD-Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar eingewogen. Nach dem Abkühlen auf circa 50 °C wurde der YPD-Agar steril etwa 1 cm hoch in Petrischalen gegossen und nach Aushärten bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des YPD-Mediums (*yeast extract peptone dextrose*-Medium)

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Pepton aus Casein	20,0
Hefeextrakt	10,0
Glucose	20,0

Produktionsmedium für die Kultivierung oleogener Hefen im Rührkesselreaktor

Als Produktionsmedium in den Rührkesselreaktoren wurde ein modifiziertes, definiertes Medium nach Hassan et al. (1996) (siehe Tabelle 4.2) eingesetzt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Medienbestandteile außer der Kohlenstoffquelle in VE-Wasser gelöst, der pH gegebenenfalls eingestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die zuvor separat hergestellte, konzentrierte Kohlenstoffquelle sowie die Spurenelement- und Vitaminlösung wurden steril zum Medium in entsprechender Menge zugegeben und das Medium anschließend bei 4 °C gelagert (Einsatz im Bioreaktorblock) oder direkt verwendet (Einsatz im Laborrührkesselreaktor). Die Spurenelement- und Vitaminlösung wurde zur Sterilisation sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert. Wurde der Einfluss einzelner Medienbestandteile

auf die Lipidproduktion untersucht, erfolgte die Zugabe des untersuchten Salzes ebenso separat und steril. Dies wird in den entsprechenden Kapiteln genauer erläutert.

Tabelle 4.2: Definiertes Medium (Produktionsmedium) für Satz- und Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor mit einem Start-C/N-Verhältnis von 15 g g⁻¹; *Statt Glucose wurden auch anderen Kohlenstoffquellen wie Galactose, Mannose, Rhamnose, Xylose oder Arabinose eingesetzt.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Glucose*	20,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,45
KH ₂ PO ₄	2,40
Na ₂ HPO ₄	0,91
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,00
	Konzentration, mL L ⁻¹
Antischaummittel AF204	1
Spurenelementlösung (100x)	10
Vitaminlösung (100x)	10

Tabelle 4.3: Spurenelementlösung (100-fach konzentriert) für das Produktionsmedium

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
CaCl ₂	2,72
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,75
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,13
MnSO ₄ * H ₂ O	0,50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,61

Tabelle 4.4: Vitaminlösung (100-fach konzentriert) für das Produktionsmedium

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Myo-Inositol	12,5
Nikotinsäure	0,5
Calcium-D(+)-Pantothenat	0,678
Thiamin-Hydrochlorid	0,56
Pyridoxin-Hydrochlorid	0,753
D(+)-Biotin	0,0125

Vor Inokulation der Rührkesselreaktoren wurden die Zellen mit sterilem PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,4) (siehe Tabelle 4.5) gewaschen. Ebenso wurde für die Messung der optischen Dichte die Zellsuspension mit PBS (pH 7,4) entsprechend verdünnt. PBS wurde gegebenenfalls durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.5: Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*; PBS)

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Alle weiteren, verwendeten Stammlösungen sind im Anhang gelistet.

4.3 Kultivierung oleogener Hefen

Im Folgenden werden alle notwendigen Vorgehensweisen für die Kultivierung oleogener Hefen ausgehend von der Stammhaltung über die Vorkulturherstellung bis hin zu Kultivierung in Rührkesselreaktoren erläutert.

4.3.1 Stammhaltung

Die Hefestämme wurden entweder als Lebendkultur direkt von der Stammsammlung bezogen oder vom Projektpartner so erhalten. Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glyceringefrierkulturen bei -80 °C. Hierfür wurde ein Schüttelkolben mit sterilem YPD-Medium mit Zellen von einer Agarplatte angeimpft und für 15 - 20 h bei 30 °C, 250 rpm und 5 cm Exzentrizität inkubiert. Die Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 15 % sterilem Glycerin vermischt und als 500 µL Aliquots bei -80 °C eingefroren. Für die kurzfristige Stammhaltung wurden 100 µL einer Glyceringefrierkultur steril auf einer YPD-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Agarplatte mit Parafilm® verschlossen und maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

4.3.2 Vorkulturherstellung

Die Herstellung der Vorkulturen erfolgte in 500 mL Schüttelkolben mit 100 mL YPD-Medium. Dazu wurden die Schüttelkolben mit Zellen einer frischen Agarplatte inokuliert. Nach Inkubation für 24 h bei 30 °C, 250 rpm und 5 cm Exzentrizität wurde die Kultur unter dem Mikroskop auf bakterielle Verunreinigungen geprüft und anschließend bei 3221 g für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und aufkonzentriert. Zur Inokulation des Parallelbioreaktorblocks im Millilitermaßstab wurde die Zellkonzentration des Inokulums auf 10 g L⁻¹ eingestellt und mit 10 % inokuliert, sodass die Anfangsbiomassekonzentration bei 1 g L⁻¹ lag. Zur Inokulation des Laborrührkesselreaktors im 3 L-Maßstab wurde die Zellkonzentration des Inokulums gemessen und danach mit 20 - 40 mL inokuliert, sodass die Anfangsbiomassekonzentration ebenfalls bei 1 g L⁻¹ lag. Im Gegensatz hierzu wurde der Rührkesselreaktor im 30 L-Maßstab nach Kontrolle der Vorkultur unter dem Mikroskop direkt mit 10 % Inokulum ohne den Waschschrift mit PBS angeimpft.

4.3.3 Parallele Satz- und Zulaufkultivierungen im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab

Zur effizienten und schnellen Analyse der Verwertung mehrerer Einzelzucker und Zuckergemische oder verschiedener Medien durch die Hefen *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus* wurde ein automatisiertes Parallelbioreaktorsystem, der Bioreaktorblock (bioREACTOR, 2mag AG, München), eingebettet in einen Pipettierroboter (Tecan, Crailsheim) eingesetzt (siehe Abbildung 4.1).

Aufbau

Der Bioreaktorblock kann mit bis zu 48 Einweg-Rührkesselreaktoren bestückt werden. Die Begasung und Durchmischung erfolgt über gas-induzierende Rührer (Hortsch und Weuster-Botz, 2010; Weuster-Botz, 2005) und eine Waschflasche für Wasserdampfsättigung der Zuluft, um Verdunstung zu vermeiden (Schmideder et al., 2015). Der Bioreaktorblock ist in einen Laborroboter (Freedom EVO®, Tecan GmbH, Crailsheim) integriert, der zusätzlich ein Mikrotiterplatten(MTP)-Photometer sowie eine MTP-Waschstation zur Automatisierung besitzt. Die Steuerung des Pipettier- und Greifarmes des Laborroboters erfolgt über die Software Gemini. Diese wird über die Prozessleitsoftware Fedbatch-XP (DASGIP – an Eppendorf company, Jülich) geleitet, sodass eine pH-Kontrolle, regelmäßige automatisierte Probenahmen zur *atline* OD-Messung und die Zugabe von Zulaufmedium ermöglicht werden. Außerdem ist der Bioreaktorblock an ein Wasserbad zur Temperierung der Reaktoren sowie ein Kühlbad zur Temperierung des Kopfraums angeschlossen.

Das Arbeitsvolumen der Einweg-Bioreaktoren aus Polystyrol beträgt zwischen 8 - 14 mL. Sie sind am Boden mit zwei Fluoreszenzsensoren zur *online* pH- und pO₂-Messung ausgestattet, welche über Sensorriegel (MCR 8*2 v5, PreSens GmbH, Regensburg), die unterhalb des Bioreaktorblocks angebracht sind, berührungslos angeregt und ausgelesen werden. Zur pH-Messung und -Kontrolle werden die Fluoreszenzsignale mit den Medien-pH für jede Reaktorcharge einmalig über eine Boltzmann-Funktion korreliert. Anschließend erfolgt die pH-Regelung über Fedbatch-XP (DASGIP – an Eppendorf company, Jülich) (Höfel, 2011).

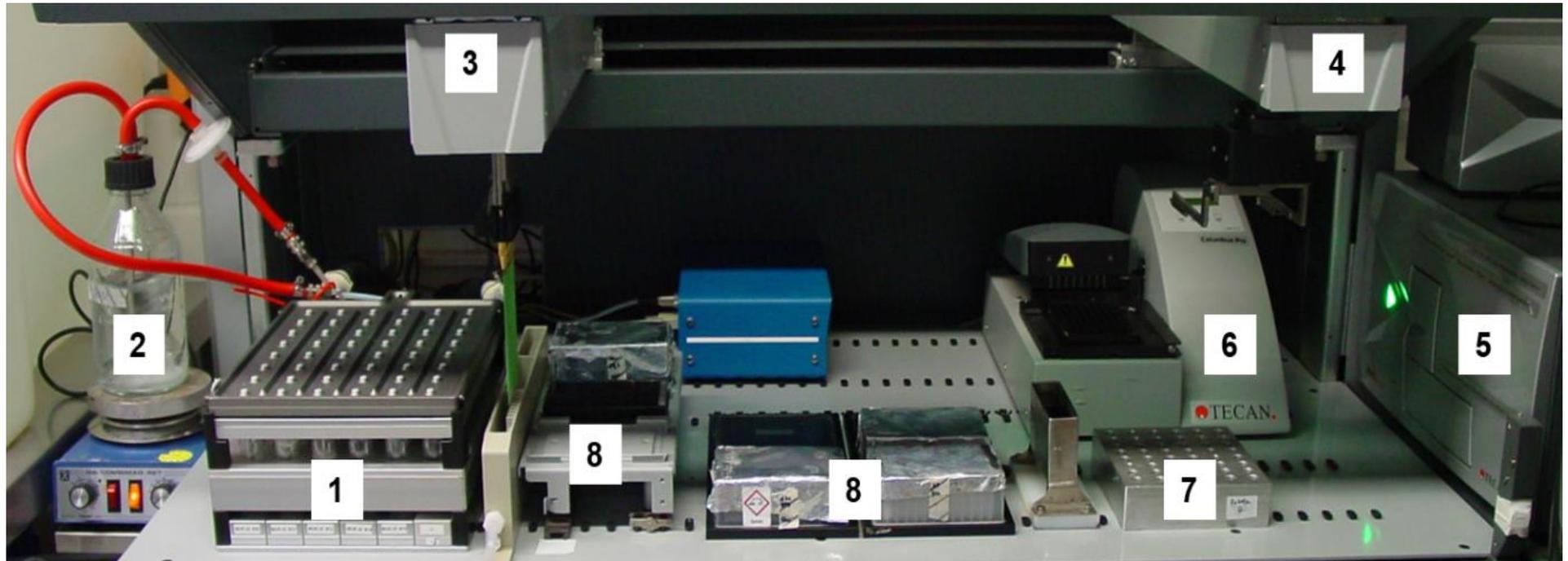


Abbildung 4.1: Aufbau des Parallelrührkesselsystems im Milliliter-Maßstab

Der Bioreaktorblock (1) wird über eine Zuluftflasche (2) mit feuchter Luft begast und wird über einen Pipettierroboter, der mit einem Pipettierarm (3) und Greifarm (4) ausgestattet ist, automatisiert betrieben. Auf der Arbeitsfläche des Laborroboters sind ein Mikrotiterplatten-Photometer (5), eine Waschstation für Mikrotiterplatten (6), ein Gestell für manuelle Proben (7) sowie Vorlagegefäße (8) für Titrationen, Zulaufmedium, Puffer und Antischaummittel zu sehen.

Versuchsdurchführung

Die Einweg-Bioreaktoren wurden steril verpackt geliefert. Diese wurden unter einer Sterilbank ausgepackt und in den Bioreaktorblock eingesetzt. Die Befüllung mit Produktionsmedium erfolgte entweder über eine autoklavierte Dispensette oder mit autoklavierten 10 mL-Pipetten. Zur Untersuchung des Einfluss von Medienbestandteilen wurden diese einzeln aus konzentrierten Stammlösungen in entsprechender Menge ebenfalls unter der Sterilbank in die Reaktoren zugegeben. Anschließend wurde der Bioreaktorblock mit der autoklavierten Sterilgasabdeckung, an welcher auch die Rührer befestigt sind, verschlossen, abgedeckt auf die Arbeitsfläche des Laborroboters transportiert und an die Rührersteuerung, Begasung sowie die Wasserbäder angeschlossen. Die Begasung mit Wasserdampf gesättigter steriler Luft erfolgte mit $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$, die Reaktortemperatur lag bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, die Kopfraumtemperatur bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Rührerdrehzahl bei 2800 rpm.

Die sterilen Vorlagegefäße wurden jeweils mit sterilem PBS zur Verdünnung der Proben zur OD-Messung, sterilem VE-Wasser, steriler 1 M KOH und bei Zulaufkultivierungen mit sterilem Zulaufmedium befüllt und ebenfalls auf der Arbeitsfläche des Laborroboters platziert. Zusätzlich wurden eine 96er Deepwell-Platte mit sterilem Antischaummittel sowie zwei MTP zur Probennahme und OD-Messung vorbereitet. Vor jeder Kultivierung erfolgte die Reinigung der Leitungen des Laborroboters, der Pipettieradeln sowie der MTP-Waschstation mit einer Reinigungslösung (*Daily System Clean* von LVL, Crailsheim).

Die Inokulation der einzelnen Bioreaktoren erfolgte erst nach Anschluss des Bioreaktorblocks mit 10 % Inokulum durch eine Multipette (Eppendorf, Hamburg) über die Öffnungen der Sterilgasabdeckung. Das Arbeitsvolumen im Milliliter-Parallelreaktorsystem betrug in allen Kultivierungen 10 mL. Die automatische OD-Messung wurde alle 2 - 3 h durchgeführt, während manuelle Probennahmen wie für Substratanalytik zu verschiedenen Zeitpunkten, mindestens jedoch im 24 h-Takt, erfolgten. Nach jedem Pipettiervorgang des Pipettierarms wurden dessen Spitzen mit sterilem VE-Wasser gespült oder zusätzlich in 70 % Ethanol automatisiert desinfiziert, um Kontaminationen mit Umgebungskeimen oder Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Dazu wurde vor jeder Kultivierung ein Vorratstank, welcher über einen Sterilfilter an den Laborroboter angeschlossen ist, mit VE-Wasser befüllt und nach jeder Kultivierung der Abfalltank mit flüssigem Biomüll entleert.

4.3.4 Satz- und Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab

Für Satz- und Zulaufkultivierungen im Labormaßstab wurde ein Glasrührkesselreaktor (Labfors 3, Infors HAT, Bottmingen, Schweiz) mit einem nominalen Arbeitsvolumen von 5 L verwendet. Der Rührkesselreaktor war mit einem Strömungsbrecher, einem Probenahmerohr, einem Begasungsrohr, Sonden für pH- und pO_2 -Messung sowie Antischaumlevelkontrolle und Zulaufstutzen für die Zugabe von Titrationsmittel, Antischaumlösung oder Zulaufmedium, die

über den Reaktordeckel befestigt wurden, und einem Rührorgan mit 3 *Rushton*-Turbinen ausgestattet. Die Steuerung der Prozessparameter wie Temperatur, Rührerdrehzahl, Begasungsrate, pH und Zulaufprofil erfolgte nach Anschluss an eine Kontrollstation und einem PC über die Software Iris. Gleichzeitig konnte über die Software eine Steuersequenz geschaltet werden, die für die Kontrolle der pO_2 -Konzentration auf über 20 % durch Erhöhung der Rührerdrehzahl und Begasungsrate und bei Zulaufkultivierungen für das konstante Zulaufprofil genutzt wurde. Die Rührerdrehzahl lag zu Beginn jedes Prozesses bei 800 rpm, die Begasungsrate bei 2 L min^{-1} . Zusätzlich wurde in einigen Versuchen die Abluft mittels einer Abgasanalytik, die hinter die Abluftstrecke geschaltet wurde, hinsichtlich CO_2 - und O_2 -Gehalt untersucht und die Messwerte über Iris aufgezeichnet. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

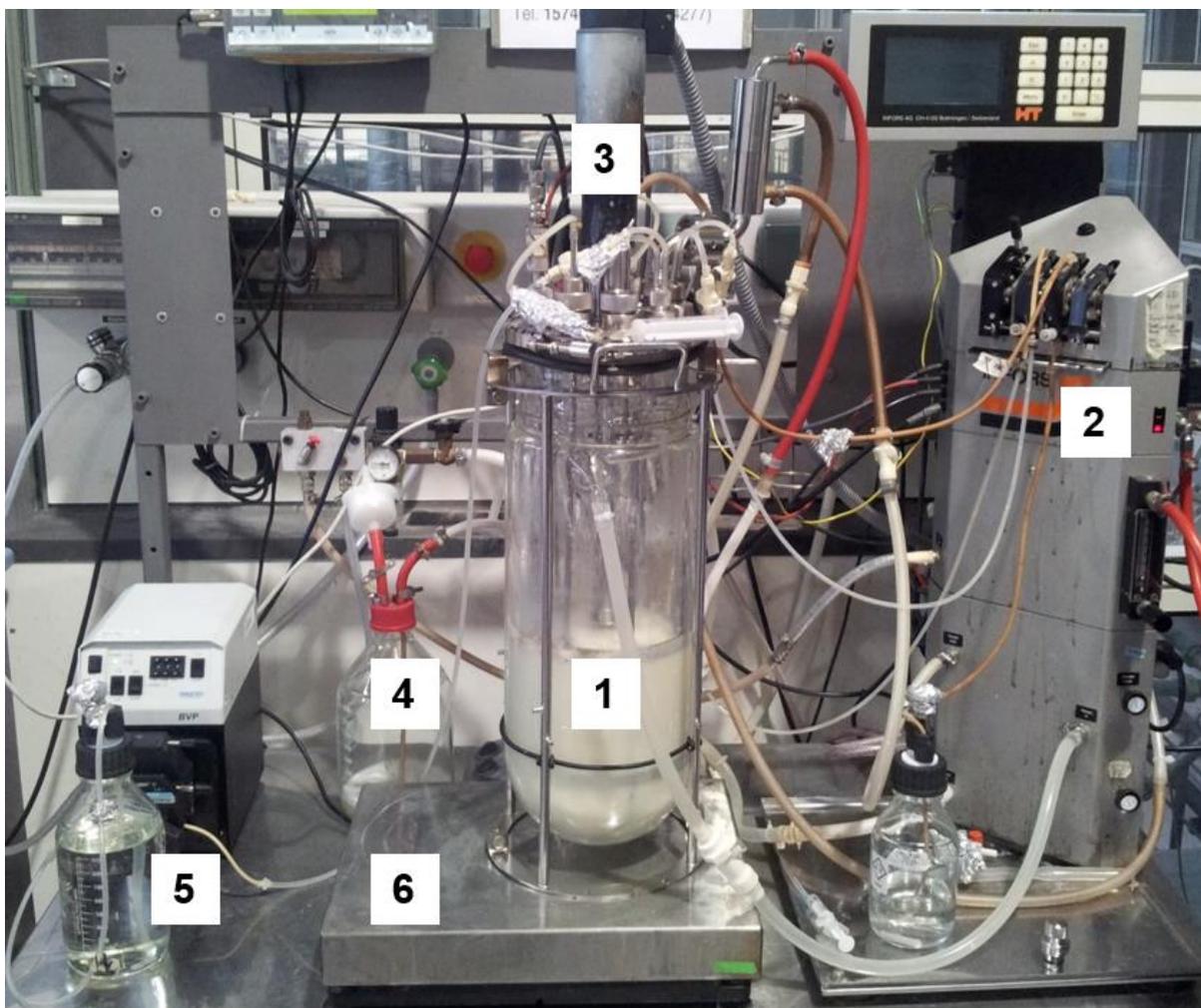


Abbildung 4.2: Aufbau des Laborrührkesselreaktors für Satz- und Zulaufkultivierungen

Der Glasrührkesselreaktor (1) mit Strömungsbrecher und Doppelmantel für Temperierung ist mit einer Kontrollstation (2), die die Zugabe von Titrationsmittel und Antischaummittel regelt, verbunden. Über den Reaktordeckel werden die Sonden, Zulaufstutzen sowie der Motor für das Rührorgan (3) befestigt. Die Abluft wird über einen Abluftkühler und eine Schaumfalle (4) zur Messstation der Abgasanalytik geleitet. Bei Zulaufkultivierungen kann über eine externe Pumpe das Zulaufmedium (5) mit einem Zulaufprofil zugepumpt werden. Die Prozesskontrolle und Datenerfassung erfolgt über einen PC und eine Software (nicht gezeigt).

Vor jeder Kultivierung wurde der Reaktor mit Produktionsmedium (außer Kohlenstoffquelle) befüllt, mit Strömungsbrecher, Probenahmerohr, Begasungsrohr, Abgaskühler, Sonden und Septum bestückt. Die pH-Sonde wurde über eine Zweipunktkalibration an der Kontrollstation kalibriert. Anschließend wurde der Rührkesselreaktor bei 121 °C für 20 min in einem Autoklaven sterilisiert und an die Versuchsstation angeschlossen. Nach steriler Zugabe der getrennt autoklavierten Kohlenstoffquelle wurden die Prozessparameter über die Software Iris eingestellt und die pO₂-Sonde sowie gegebenenfalls die Abgasanalytik über eine Zweipunktkalibration kalibriert. Die Inokulation erfolgte durch Zugabe der Zellen über eine Spritze und das Septum. Bei Zulaufkultivierungen wurde die Zulaufpumpe vor Versuchsstart mit dem Zulaufmedium ebenfalls kalibriert.

4.3.5 Kontinuierliche Prozessführung im Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung

Für die kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung wurden zwei Systeme eingesetzt: zum einen ein Glasrührkesselreaktor (Labfors 3, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) im 3 L-Maßstab, zum anderen zur Maßstabsvergrößerung ein Edelstahlrührkesselreaktor (LP75, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) im 30 L-Maßstab.

Kultivierung im 3 L-Rührkesselreaktor (Labfors 3)

Bei kontinuierlich geführten Prozessen im Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung („Membranbioreaktor“) im Liter-Maßstab wurde der unter 4.3.4 beschriebene Versuchsaufbau mit einem Zellseparator im Bypass erweitert. Hierfür wurde ein Ultrafiltrationsmodul (Artikelnummer UFP-750-E4A) von GE Healthcare and Life Sciences (München) als Hohlfasermembranmodul über Verbindungsschläuche und eine peristaltische Pumpe an ein Probenahmerohr im Deckel des Rührkesselreaktors angeschlossen. Das Hohlfasermembranmodul besteht aus 50 Hohlfasern der Länge 30 cm mit einem Innendurchmesser von 1 mm, einer Trenngrenze von 750 kDa und einer Membranfläche von 0,042 m². Vor und nach dem Zellseparator wurden zwei Manometer und eine Schlauchklemme zur Kontrolle des Transmembrandrucks (TMP) geschaltet. Der Permeatvolumenstrom wurde über eine weitere peristaltische Pumpe, die über die Prozesssoftware Iris mit einer eigenen Kontrollsequenz gesteuert wurde, geregelt, um das Reaktorvolumen konstant zu halten. Hierzu stand der Rührkesselreaktor auf einer Waage, die vor Start des Bypasses auf 0 tariert wurde (siehe Abbildung 4.3).

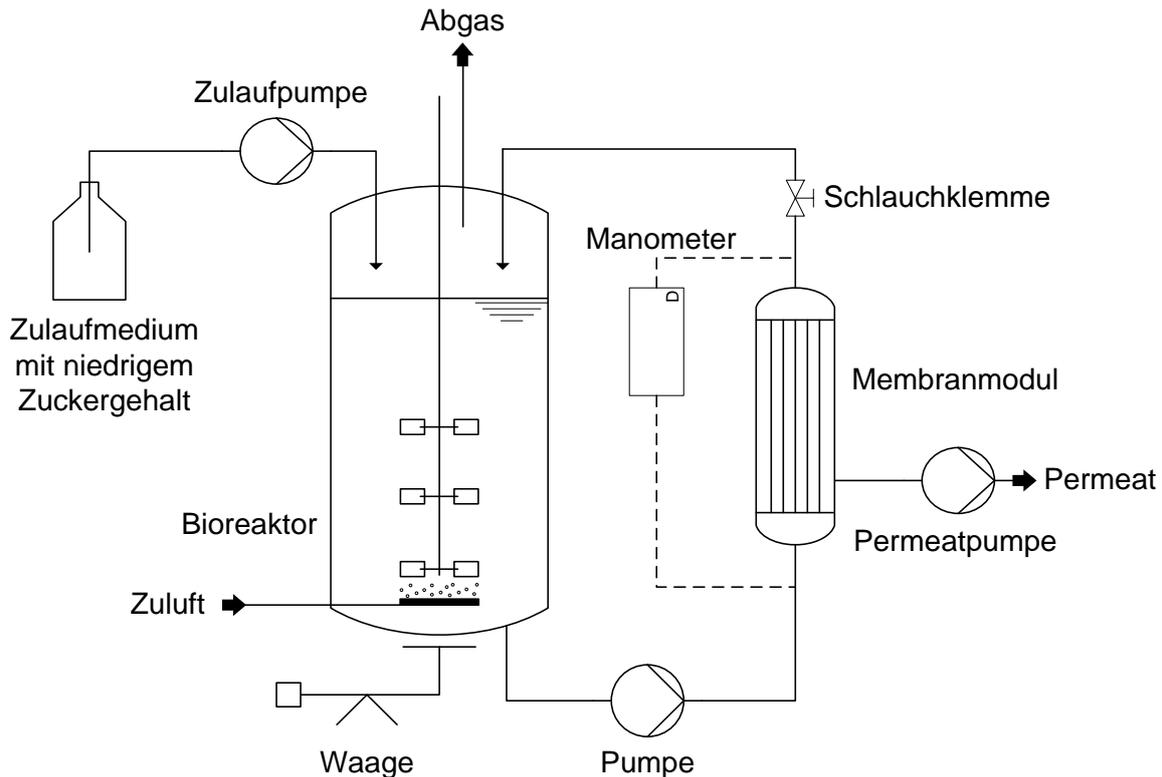


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau des Membranbioreaktors zur kontinuierlichen Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung

Die Vorbereitung des Membranbioreaktors erfolgte analog zur Vorbereitung von Satz- und Zulaufkultivierungen, außer dass zwei Probenahmerohre am Deckel eingesetzt wurden: eines für die tatsächliche Probenahme und ein zweites, um die Zellsuspension über das Membranmodul zu pumpen. Alle externen Bauteile des Bypasses wurden getrennt vom Rührkesselreaktor sterilisiert und anschließend steril verbunden. Die Schläuche wurden autoklaviert, während das Hohlfasermembranmodul chemisch mit 0,5 M NaOH sterilisiert und mit sterilem, bidestillierten Wasser gespült wurde.

Zur Reinigung wurde das Hohlfasermembranmoduls nach Ende des Prozesses zuerst mit 1 L VE-Wasser gespült, dann wurde 70 % Ethanol für 30 - 60 min im Kreis durch die Membranen gepumpt, bevor dieses mit 1 L VE-Wasser heraus gespült wurde. Anschließend wurde das Hohlfasermembranmodul chemisch mit 1 L 0,5 M NaOH sterilisiert. Erfolgte eine längerfristige Lagerung des Moduls so wurde es daraufhin erst mit 1 L VE-Wasser und dann mit 30 % Ethanol gespült, bei kurzfristiger Lagerung wurde stattdessen gleich steriles, bidestilliertes Wasser verwendet.

Kultivierung im 30 L-Rührkesselreaktor (LP 75L)

Die Vorbereitung und Durchführung der Maßstabsvergrößerung erfolgte am TUM-Technikum für Weiße Biotechnologie mit einem Rührkesselreaktor LP 75L (Bioengineering AG, Wald, Schweiz), welcher mit 30 L Arbeitsvolumen betrieben wurde. Die Vorkulturherstellung sowie

Medienvorbereitung erfolgte wie in 4.2 und 4.3.2 beschrieben mit folgenden Ausnahmen: bei der Herstellung des Satzmediums wurden statt der Kohlenstoffquelle die Stickstoff- und Magnesiumquelle getrennt vom Medium autoklaviert und anschließend steril zugeben, da dies von der Durchführung leichter war, und beim Zulaufmedium wurde nur die Glucoselösung autoklaviert und alle weiteren Medienbestandteile in den Medientank sterilfiltriert.

Der Versuchsaufbau zeigt sich fast analog zum Aufbau im Liter-Maßstab mit folgenden Unterschieden: die Rezirkulationspumpe, mit der die Zellen aus dem Reaktor über das Zellrückhaltesystem gepumpt wurden, war eine Membranpumpe (SartoJet, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) und das Zellrückhaltesystem im 30 L-Maßstab war eine handelsübliche Querstromfiltrationsanlage (Sartocon Slice, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) ausgestattet mit 3 Hydrosart®-Filterkassetten mit jeweils 0,1 m² Membranfläche mit 0,2 µm Porengröße (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Somit betrug die relative Membranfläche im 30 L-Maßstab 0,01 m² L_{Arbeitsvolumen}⁻¹, während sie im Liter-Maßstab 0,015 m² L_{Arbeitsvolumen}⁻¹ betrug. Die Porengröße war im Liter-Maßstab mit 750 kDa kleiner als im 30 L-Maßstab mit 0,2 µm. Als Bedingungen für die Maßstabsvergrößerung wurde neben der Verdünnungsrate D die Verweilzeit der Zellen im Reaktor beziehungsweise im Bypass gewählt. Die Kennzeichen beider Systeme sind in Tabelle 4.6 vergleichend gegenüber gestellt.

Tabelle 4.6: Vergleich der Versuchsaufbauten der Membranbioreaktoren im Liter- und 30 L-Maßstab. Die Kriterien der Maßstabsvergrößerung sind **fett** hervorgehoben.

	Liter-Maßstab	30 L-Maßstab
Rührkesselreaktor	Glasrührkesselreaktor Labfors 3 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)	Edelstahlrührkesselreaktor LP 75L (Bioengineering AG, Wald, Schweiz)
Arbeitsvolumen	2,84 L	30,0 L
Bypassvolumen	75,7 mL	800 mL
Filterart und -modul	Hohlfasermembranmodul mit 50 Hohlfasern (ID 1 mm)	Querstromfiltrationsanlage mit Hydrosart®-Filterkassetten
Porengröße	750 kDa	0,2 µm
Relative Membranfläche	0,015 m ² L _{Arbeitsvolumen} ⁻¹	0,01 m ² L _{Arbeitsvolumen} ⁻¹
Rezirkulationspumpe (Pumprate)	Peristaltikpumpe (0,454 L min ⁻¹)	Membranpumpe (4,8 L min ⁻¹)
Verweilzeit im Bypass	10 s	10 s
Verweilzeit im Reaktor	6,25 min	6,25 min
Verhältnis Bypassvolumen zu Arbeitsvolumen	1:37,5	1:37,5
Verdünnungsrate D	0,065 h⁻¹	0,065 h⁻¹

Die Sterilisation der Verbindungsschläuche zwischen Querstromfiltrationsanlage und Reaktor erfolgte mit Dampf bei 121 °C für 20 min, während die Filterkassetten chemisch mit 1 M NaOH sterilisiert wurden und anschließend mit sterilen VE-Wasser gespült wurden. Die Reinigung der Filterkassetten erfolgte mit VE-Wasser, 1 M NaOH bei 50 °C und 2 % H₃PO₄, die Lagerung in 20 % Ethanol.

Die Regelung des Reaktorvolumens erfolgte nicht über eine Waage, sondern über den Einsatz einer Niveausonde, die auf Höhe des Arbeitsvolumens von 30 L montiert war und ein Einschalt-Signal an die Permeatpumpe gibt, wenn das Reaktorvolumen die Antischaumsonde erreicht. Sinkt das Reaktorvolumen wieder, gibt es kein Signal und die Permeatpumpe steht still. Als Überlaufschutz wurde eine zweite Niveausonde verwendet, die erst bei sehr hohem Reaktorvolumen ein Signal auslöst, welches die Zulaufpumpe stoppt.

4.4 Herstellung und Vorbehandlung von Algenhydrolysat

Für den Einsatz von Algenhydrolysat als Fermentationsmedium musste aufgeschlossene, gefriergetrocknete, teils mit superkritischem CO₂ extrahierte Algenbiomasse zuerst enzymatisch hydrolysiert werden und gegebenenfalls das darin enthaltene Phosphat chemisch gefällt werden. Als Algenbiomasse diente hierbei entweder eine käuflich erworbene *Scenedemus*-Mischkultur, welche mit superkritischem CO₂ extrahiert war und für die Satzversuche eingesetzt wurde, oder Biomasse von *Scenedesmus ovalternus*, welche freundlicherweise von Anja Koller (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Biomasse wurde nicht mit superkritischem CO₂ behandelt und fand Einsatz als Fermentationsmedium im Membranbioreaktor.

4.4.1 Enzymatische Hydrolyse von Restalgenbiomasse im Liter-Maßstab

Die gefriergetrocknete Algenbiomasse wurde mit einer Konzentration von 250 g L⁻¹ in 50 mM (sterilem) Natriumacetatpuffer (NaOAc) mit pH 5,5 vermischt und bei 50 °C für 72 - 96 h mit 1 % (v/v) des kommerziell verfügbaren Enzymgemisches CellicCTec2® von Novozymes inkubiert. Das Enzymgemisch enthält sowohl Cellulasen als auch Hemicellulasen für die Hydrolyse. Bis zu einem Volumen von 500 mL fand die Hydrolyse in gerührten 1 L-Schottflaschen bei 600 rpm in einem Inkubator statt. Die Herstellung von 5 L Algenhydrolysat fand in Rührkesselreaktoren bei 800 rpm statt. Nach der Hydrolyse erfolgte die Phasentrennung zwischen Restalgenbiomasse und Flüssigphase („Algenhydrolysat“) in einer Zentrifuge bei 3260 g für 30 - 60 min. Das Algenhydrolysat wurde anschließend via HPLC hinsichtlich des Zuckergehalts analysiert und bei 4 °C gelagert.

4.4.2 Chemische Phosphatfällung von Algenhydrolysat

Für den in 7.1.4 dargestellten Versuch erfolgte eine Vorbehandlung des Algenhydrolyсата vor Einsatz als Fermentationsmedium. Hierfür wurde eine chemische Phosphatfällung mit FeCl₃

durchgeführt, um ein Medium mit niedrigem Phosphatgehalt (P-Limitierung) zu erhalten. Für Vorversuche wurden das Algenhydrolysat und ein Kontrollpuffer im Bioreaktorblock mit S-Rührern (Riedlberger et al., 2013) bei 1000 rpm, 25 °C und 10 mL Arbeitsvolumen gefällt. Später wurde das Algenhydrolysat bei 500 rpm (3 6-Blatt-Ruhston-Turbinen), 25 °C und 5 L Arbeitsvolumen in einem Rührkesselreaktor gerührt. Zuerst erfolgt die Zugabe des Fällungsmittels (konzentrierte $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), anschließend wurde so viel 5 M KOH zugegeben, dass der pH auf 5,0 - 5,5 eingestellt war, um eine optimale Fällung des FePO_3 zu ermöglichen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde das gefällte Phosphat in Form von FePO_3 über Zentrifugation bei 3260 g für 60 min entfernt und die Flüssigphase („phosphatgefälltes Algenhydrolysat“) in eine sterile Schottflasche filtriert (0,5 μm) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Das phosphatgefällte Algenhydrolysat wurde anschließend via HPLC hinsichtlich des Zuckergehalts und mittels eines Testkits (Phosphate Colorimetric Kit, Sigma Aldrich, München) hinsichtlich des Phosphatgehalts analysiert.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Zellkonzentration wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt: Zum einen erfolgte eine *atline*-Bestimmung der Zellkonzentration mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Einstrahl-Küvettenphotometer (Genesys 10S, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Zellsuspension wurde bei Bedarf mit PBS-Puffer (pH 7,4) verdünnt, sodass der Messwert im linearen Bereich des Photometers (OD_{600} 0,1 - 0,4) lag. Zum anderen wurde *offline* eine Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration durchgeführt. Hierfür wurden 2 mL der Zellsuspension in vorgewogenen, getrockneten Eppendorfreaktionsgefäßen (ERG) bei 13.000 rpm für mindestens 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet für mindestens 24 h bei 80 °C getrocknet und wieder gewogen. Die Zellkonzentration (lipidhaltige Biotrockenmassekonzentration c_{X+L}) errechnet sich aus Gleichung 4.1.

$$c_{X+L} = \frac{(m_{\text{ERG,voll}} - m_{\text{ERG,leer}})}{V_{\text{Probe}}} \quad (4.1)$$

c_{X+L}	lipidhaltige Biotrockenmassenkonzentration, g L^{-1}
$m_{\text{ERG,voll}}$	Masse des Eppendorfreaktionsgefäßes mit Zellen nach 24 h Trocknung, g
$m_{\text{ERG,leer}}$	Masse des leeren, getrockneten Eppendorfreaktionsgefäßes, g
V_{Probe}	Probenvolumen der Zellsuspension, L

Da eine Korrelation zwischen Biotrockenmassenkonzentration und OD_{600} nur in einem kurzen Bereich und nur für nicht limitierende Wachstumsbedingungen gültig war, wurde bei jedem

Versuch die Biotrockenmassenkonzentration wie oben beschrieben bestimmt und auf eine Nutzung eines Korrelationsfaktors verzichtet.

4.5.2 Bestimmung der Substratkonzentrationen

Enzymatische Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Die Messung der Ammoniumkonzentration wurde mit einem einstufigen Enzymtest (Ammonia Test-Kit, R-Biopharm, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis des vorhandenen Ammoniuns erfolgte indirekt über die photometrische Verfolgung der Abnahme von NADH (Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form) bei 340 nm, welches über eine Enzymreaktion stöchiometrisch mit Ammonium verbraucht wird. Der Test wurde im MTP-Format durchgeführt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibrierkurve im Bereich von 0,008 - 0,08 g L⁻¹ mittels der mitgelieferten Standardlösung. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben) wurden entsprechend mit VE-Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich des Tests zu bleiben, und als Dreifachmessung gemessen. Die Enzymlösung wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt, Lösung 1 (NADH-Pufferlösung) wurde nach Herstellerangaben hergestellt. Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.7 gezeigt.

Tabelle 4.7: Durchführung des Ammonium-Tests im Mikrotiterplatten-Format (MTP: Mikrotiterplatte)

In eine Vertiefung einer MTP pipettieren	Leerwert	Probe/Standard
Lösung 1	100 µL	100 µL
Probe/Standard	-	10 µL
VE-Wasser	180 µL	170 µL
Mischen, nach 5 min Absorption der Lösung messen (A ₁). Starten der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung (verdünnt)	20 µL	20 µL
Mischen, Stillstand abwarten (20 min) und Absorption der Lösung messen (A ₂)		

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die eingesetzten Standardkonzentrationen über ΔA aufgetragen, wobei:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{Standard/Probe} - (A_1 - A_2)_{Leerwert} \quad (4.2)$$

Die Konzentration der Proben wurde anschließend anhand der ermittelten Kalibrierkurve bestimmt und Dreifachmessungen gemittelt.

Bestimmung der Phosphatkonzentration

Die photometrische Bestimmung der Phosphatkonzentration erfolgte mit einem Phosphat-Test von Sigma Aldrich (Phosphate Colorimetric Kit, Sigma Aldrich, München) analog zu den Herstellerangaben im MTP-Format. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben) wurden

entsprechend mit bidestilliertem Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich der Messung zu liegen. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierkurve aus mitgelieferten Standards.

Bestimmung der Sulfatkonzentration

Die photometrische Bestimmung der Sulfatkonzentration erfolgte mit dem Sulfat-Test von Sigma Aldrich (Sulfate Assay Kit, Sigma Aldrich, München) analog zu den Herstellerangaben im MTP-Format. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben) wurden entsprechend mit bidestilliertem Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich der Messung zu liegen. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierkurve aus mitgelieferten Standards.

Enzymatische Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Messung der Glucosekonzentration wurde mit einem zweistufigen Enzymtest (D-Glucose Test-Kit, R-Biopharm, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis der vorhandenen D-Glucose erfolgte indirekt über die photometrische Verfolgung der Bildung von NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form) bei 340 nm, welches über eine Enzymreaktion stöchiometrisch zu Glucose gebildet wird. Der Test wurde im MTP-Format durchgeführt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibrierkurve im Bereich von 0,075 - 0,375 g L⁻¹ mittels der mitgelieferten Standardlösung. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben) wurden entsprechend mit VE-Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich des Tests zu bleiben, und als Dreifachmessung gemessen. Die Enzymlösung wurde 1:10 mit Lösung 1 verdünnt, welche nach Herstellerangaben hergestellt wurde. Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.8 gezeigt.

Tabelle 4.8: Durchführung des Glucose-Tests im Mikrotiterplatten-Format (MTP: Mikrotiterplatte)

In eine Vertiefung einer MTP pipettieren	Leerwert	Probe/Standard
Lösung 1	100 µL	100 µL
Probe/Standard	-	10 µL
VE-Wasser	180 µL	170 µL
Mischen, nach 3 min Absorption der Lösung messen (A ₁). Starten der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung (verdünnt)	20 µL	20 µL
Mischen, Stillstand abwarten (15 min) und Absorption der Lösung messen (A ₂)		

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die eingesetzten Standardkonzentrationen über ΔA aufgetragen, wobei:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{Standard/Probe} - (A_2 - A_1)_{Leerwert} \quad (4.2)$$

Die Konzentration der Proben wurde anschließend anhand der ermittelten Kalibrierkurve bestimmt und Dreifachmessungen gemittelt.

Enzymatische Bestimmung der Galactosekonzentration

Konnte die Galactosekonzentration in Zuckergemischen nicht über HPLC bestimmt werden, wurde ebenfalls ein einstufiger Enzymtest (Lactose/Galactose Test-Kit, R-Biopharm, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis der vorhandenen D-Galactose erfolgte indirekt über die photometrische Verfolgung der Bildung von NADH bei 340 nm, welches über eine Enzymreaktion stöchiometrisch zu Galactose gebildet wird. Der Test wurde im MTP-Format durchgeführt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibrierkurve im Bereich von 0,1 - 0,5 g L⁻¹ mittels der mitgelieferten Standardlösung. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben) wurden entsprechend mit VE-Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich des Tests zu bleiben, und als Dreifachmessung gemessen. Die Enzymlösung wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt. Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.9 gezeigt.

Tabelle 4.9: Durchführung des Galactose-Tests im Mikrotiterplatten-Format (MTP: Mikrotiterplatte)

In eine Vertiefung einer MTP pipettieren	Leerwert	Probe/Standard
Lösung 1	10 µL	10 µL
Probe/Standard	-	10 µL
Lösung 3	100 µL	100 µL
VE-Wasser	130 µL	120 µL
Mischen, nach 3 min Absorption der Lösung messen (A ₁). Starten der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung (verdünnt)	50 µL	50 µL
Mischen, Stillstand abwarten (15 min) und Absorption der Lösung messen (A ₂)		

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die eingesetzten Standardkonzentrationen über ΔA aufgetragen, wobei:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{Standard/Probe} - (A_2 - A_1)_{Leerwert} \quad (4.2)$$

Die Konzentration der Proben wurde anschließend anhand der ermittelten Kalibrierkurve bestimmt und Dreifachmessungen gemittelt.

Enzymatische Bestimmung der Rhamnosekonzentration

Konnte die Rhamnosekonzentration in Zuckergemischen nicht über HPLC bestimmt werden, wurde ebenfalls ein einstufiger Enzymtest (L-Rhamnose Assay, Megazyme, Bray, Irland) nach Herstellerangaben im MTP-Format durchgeführt. Der Nachweis der vorhandenen L-Rhamnose erfolgte indirekt über die photometrische Verfolgung der Bildung von NADH bei 340 nm, welches über eine Enzymreaktion stöchiometrisch zu Rhamnose gebildet wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibrierkurve im Bereich von 0,1 - 0,5 g L⁻¹ mittels der mitgelieferten Standardlösung. Die Proben (Überstände aus Reaktorproben)

wurden entsprechend mit VE-Wasser verdünnt, um im Linearitätsbereich des Tests zu bleiben, und als Dreifachmessung gemessen. Die Enzymlösung wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt. Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.10 gezeigt.

Tabelle 4.10: Durchführung des Rhamnose-Tests im Mikrotiterplatten-Format (MTP: Mikrotiterplatte)

In eine Vertiefung einer MTP pipettieren	Leerwert	Probe/Standard
Lösung 1	10 µL	10 µL
Lösung 2	10 µL	10 µL
Probe/Standard	-	10 µL
VE-Wasser	210 µL	200 µL
Mischen, nach 3 min Absorption der Lösung messen (A_1). Starten der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung (verdünnt)	20 µL	20 µL
Mischen, Stillstand abwarten (30 min) und Absorption der Lösung messen (A_2)		

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die eingesetzten Standardkonzentrationen über ΔA aufgetragen, wobei:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{Standard/Probe} - (A_2 - A_1)_{Leerwert} \quad (4.2)$$

Die Konzentration der Proben wurde anschließend anhand der ermittelten Kalibrierkurve bestimmt und Dreifachmessungen gemittelt.

HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*, Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Für die Analyse der Monosaccharide in Zuckergemischen von nicht mit einem enzymatischen Test bestimmbar Zuckern sowie von Algenhydrolysat wurde die HPLC verwendet. Hierfür wurde eine Ionenaustauschersäule (Rezex RPM Monosaccharide Pb²⁺ (8%)) von Phenomenex (Aschaffenburg) mit einer Länge von 300 mm und einem Innendurchmesser von 7,8 mm eingesetzt. Diese war mit einer Vorsäule (SecurtiyGuard Standard Carbo-Pb+2, Phenomenex, Aschaffenburg) ausgestattet und wurde bei einer Flussrate von 0,6 mL min⁻¹, einer Säulenofentemperatur von 70 °C und gefiltertem (0,2 µm), bidestillierten Wasser als Laufmittel betrieben. Als Detektor wurde ein Brechungsindexdetektor (RI Plus Detector, Thermo Scientific, Schwerte) bei 50 °C verwendet. Die Ermittlung der Konzentrationen erfolgte durch eine Kalibrierkurve mit externen Standards. Proben (Überstände aus Reaktorproben), die mittels HPLC (Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific, Schwerte; siehe Anhang) analysiert wurden, wurden vor der Messung filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

4.5.3 Bestimmung spezifischer Raten und Ausbeuten

Zum Vergleich verschiedener Hefen und Prozesse, wurden Parameter wie die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} und die zellspezifische Substrataufnahmerate q_s ermittelt. Die

spezifische Wachstumsrate μ ist in Gleichung 3.3 dargestellt und kann unter der Annahme, dass die Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase konstant ist, durch Integration zu Gleichung 4.3 vereinfacht werden.

$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (4.3)$$

Durch Logarithmieren und Umstellen ergibt sich Gleichung 4.4. Durch halblogarithmische Auftragung der Biotrockenmassenkonzentration gegen die Zeit kann die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} über lineare Regression ermittelt werden.

$$\ln\left(\frac{c_X(t)}{c_{X,0}}\right) = \mu_{max} \cdot t \quad (4.4)$$

Die zellspezifischen Substrataufnahmeraten q_S wurde über das Differenzverfahren über Gleichung 4.5 bestimmt. Die während der exponentiellen Wachstumsphase höchste zellspezifische Substrataufnahmerate wurde als maximal ($q_{S,max}$) angenommen.

$$q_S = \frac{2}{(c_{X,1} + c_{X,2})} \cdot \frac{(c_{S,1} - c_{S,2})}{(t_2 - t_1)} \quad (4.5)$$

Die Biomasseausbeute Y_{XS} wurde integral über den Gesamtzeitraum t_0 bis t_n beziehungsweise, bis der vorgelegter Zucker verbraucht war, mit Gleichung 4.6 bestimmt.

$$Y_{XS} = \frac{(c_{X,n} - c_{X,0})}{(t_0 - t_n)} \quad (4.6)$$

Die Lipidausbeute Y_{LS} wurde ebenfalls integral über den Gesamtzeitraum ermittelt. Dabei musste sowohl der vorgelegte Zucker $c_{S,Satz}$ als auch der zudosierte Zucker $c_{S,Zulauf}$ und gegebenenfalls der unverbrauchte Zucker $c_{S,Rest}$ einbezogen werden.

$$Y_{LS} = \frac{(c_{L,n} - c_{L,0})}{(c_{S,Satz} + c_{S,Zulauf} - c_{S,Rest})} \quad (4.7)$$

4.5.4 Bestimmung der Lipidkonzentration

Zur Bestimmung der Lipidkonzentration wurde zwei Methoden eingesetzt. Erstere beruht auf Anfärben der intrazellulären Triglyceride mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Nile Red* (Sigma Aldrich, München) nach Sitepu et al. (2012). Hierfür müssen die Zellen nicht aufgeschlossen werden, sondern werden mit PBS auf eine OD_{600} von 0,5 - 2 verdünnt, davon 200 μL in eine Vertiefung einer MTP mit schwarzem Boden (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) pipettiert und die OD_{600} in einem MTP-Photometer gemessen. Nach Zugabe von 20 μL einer DMSO-PBS-Mischung (1:1) (Dimethylsulfoxid) und 20 μL einer *Nile-Red*-Stammlösung ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ *Nile Red* in Aceton) erfolgte die Messung der Fluoreszenz mit einer Anregung bei 530 nm und

Emission bei 590 nm über 20 min mit einem Intervall von 1 min. Zur Auswertung wurde die maximale Fluoreszenzintensität, die während der Messung erreicht wurde, über eine Korrelation in den Lipidgehalt umgerechnet. Die Korrelation wurde zuvor mit gravimetrisch bestimmten Lipidgehalten erstellt und lautet:

$$Y_{LX} (\%) = 0,0076 \% \cdot \text{Nile Red Intensität}_{\text{normiert}} + 11,382 \%$$

Als zweite, zuverlässigere Methode wurde eine Messung der in der Probe enthaltenen Fettsäuremethylester (FAMEs, *fatty acid methyl esters*) via Gaschromatographie (GC) (GC-2010 Plus, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg; siehe Anhang) eingesetzt, die neben dem Gesamtlipidgehalt der Probe auch deren Fettsäurespektrum analysiert. Hierfür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Griffiths et al. (2010) zur Probenvorbereitung verwendet: zu circa 10 - 20 mg lyophilisierter Probe werden 450 μL Toluol sowie 50 μL einer C12-Triglyceridstammlösung (C12-TAG: 2 mg mL^{-1}) pipettiert. Nach Zugabe von 100 μL 2,2-Dimethoxypropan und 1 mL einer Natriummethoxid-Stammlösung (0,5 mM in Methanol) folgt ein Inkubationsschritt bei 80 °C und 600 rpm für 20 min. Nachdem die Proben 5 min auf Eis abgekühlt sind, wird 1 mL einer HCl-Methanollösung (5 % HCl in Methanol) hinzu pipettiert und die beiden Inkubationsschritte wiederholt. Nach Zugabe von 400 μL bidestilliertem Wasser und 400 μL Hexan werden die Proben gut durchgemischt. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 1 min. 200 μL der oberen, organischen Phase werden in GC-Glasgefäße gegeben, gasdicht verschlossen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Messung erfolgte in der Regel spätestens ein Tag nach Probenvorbereitung.

Als Trennsäule wurde eine Zebtron™ ZB-Wax (Phenomenex, Aschaffenburg) mit einer Säulenlänge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,32 mm und einer Schichtdicke von 0,25 μm eingesetzt. Als Trägergas wurde Wasserstoff, als Make-Up-Gas Stickstoff mit einem Split-Verhältnis von 1:10 verwendet. Die Detektortemperatur des Flammenionisationsdetektors betrug 245 °C, die Temperatur des Injektors lag bei 240 °C. Die Elution der FAMEs erfolgte über einen Temperaturgradienten. Gestartet wurde bei einer Temperatur von 150 °C, welche für 1 min gehalten wurde. Anschließend erfolgte ein Gradient mit 5 °C min^{-1} bis zu einer Endtemperatur von 240 °C, die für 2 min gehalten wurde.

4.5.5 Kohlenstoffbilanz

Bei aeroben, mikrobiellen Prozessen wandeln die Mikroorganismen den zugeführten Kohlenstoff der Substrate (zum Beispiel Glucose) in Biomasse, Produkte (zum Beispiel Triglyceride) und gebildetes CO_2 um. Die Kohlenstoffbilanz wird über die Stoffmengen der aufgenommenen Substrate ($m_{E,ij}$) und der gebildeten Produkte ($m_{P,ij}$) formuliert.

$$1 = \frac{\sum m_{P_i,j}}{\sum m_{E_i,j}} \quad (4.8)$$

$m_{P,i,j}$ Kohlenstoffmenge j der gebildeten Produkte P_i , mol L⁻¹

$m_{E,i,j}$ Kohlenstoffmenge der aufgenommen Edukte E_i , mol L⁻¹

Bei den Kultivierungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab konnten Kohlenstoffbilanzen aufgestellt werden, sofern ein definiertes Medium verwendet wurde und die CO₂-Bildung über eine Abgasanalytik gemessen wurde. Für die Biomasse wurde hierfür die Summenformel CH_{1,8}O_{0,54}N_{0,14} (Von Stockar und Liu, 1999) verwendet, für die Lipide als Produkt wurde die Summenformel C_{20,6}H_{35,82}O₂, die aus den hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren beziehungsweise Triglyceriden ermittelt wurde, eingesetzt. Das gebildete CO₂ wurde über den Versuchszeitraum integriert, um die Gesamtmenge des emittierten CO₂ zu erhalten. Bei Zulaufkultivierungen wurde ebenfalls die Volumenänderung aufgrund von Probenahmen und Zulauf berücksichtigt. Die Kohlenstoffbilanzen wurden mit Gleichung 4.3 berechnet und waren zu mindestens 90 % geschlossen. Es werden hier deshalb nur ausgewählte Bilanzen gezeigt.

5 Substratspektrum von *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus*

Dieses Kapitel behandelt die Substratverwertung verschiedener Pentosen und Hexosen durch zwei oleogene Hefen, *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus*, für Wachstum und Lipidbildung. Dabei wurden insbesondere solche Monosaccharide untersucht, die in Mikroalgen als Polysaccharide vorkommen und durch enzymatische Hydrolyse gewonnen werden können. Für jede Hefe wurde der Substratverbrauch der Einzelzucker Arabinose, Xylose, Galactose, Glucose, Mannose und Rhamnose sowie einer Modellzuckerlösung aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose, welche die in allen Algen am häufigsten vorkommenden Monosaccharide repräsentiert, untersucht. Zudem wurde das Wachstum mit echtem Mikroalgenhydrolysat betrachtet.

5.1 *Trichosporon oleaginosus*

5.1.1 Wachstum

Substratverwertung von Einzelzuckern

Um die Verstoffwechslung von sechs Monosacchariden durch *T. oleaginosus* zu untersuchen, wurden Satzkultivierungen in definiertem Medium mit 10 g L⁻¹ Zucker bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur, pH 6,5 und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ über 20 h durchgeführt (siehe Abbildung 5.1). Die automatische Probennahme für die Messung der OD₆₀₀ erfolgte alle 2 h, die manuelle Probennahme zur Messung der Zuckerkonzentration erfolgte alle 2 h bis 8 h Prozesszeit. Die Endprobe nach 20 h wurde des Weiteren für die Bestimmung der Biotrockenmasse genutzt. Aufgrund eines Fehlers bei der automatischen Probennahme durch den Pipettierroboter erfolgte nach 12 h keine weitere Messung der OD₆₀₀, bis der Fehler am nächsten Tag behoben werden konnte.

Der Verlauf der OD₆₀₀ ist für die Zucker Glucose und Mannose bis 4 h sehr ähnlich (Abbildung 5.1 A) und deutet auf ein exponentielles Wachstum hin. Bei 6 h Prozesszeit werden die Maximalwerte erreicht, die sich mit einer OD₆₀₀ von 10,5 für Glucose und 13,1 für Mannose um den Faktor 1,25 unterscheiden. Anschließend nimmt die OD₆₀₀ wieder ab, was mit dem Verbrauch des Satzzuckers zwischen 4 h und 6 h zu erklären ist. Der Kurvenverlauf der OD₆₀₀ für Galactose gestaltet sich nach einer anfänglichen Verzögerungsphase von 2 h deutlich flacher als für die anderen beiden Zucker. Allerdings kann eine Zunahme der OD₆₀₀ bis 12 h bis zu einem Maximum von 10,0 beobachtet werden, was bedeutet, dass circa bis zu diesem Zeitpunkt die Kohlenstoffquelle noch vorhanden sein muss. Daten der Gelöstsauerstoffkonzentration lassen ein Verbrauchen des Zuckers nach 12,1 h vermuten

(Daten nicht gezeigt). Auch die Abnahme der Galactosekonzentration ist deutlich langsamer als für Glucose und Mannose (Abbildung 5.1 C).

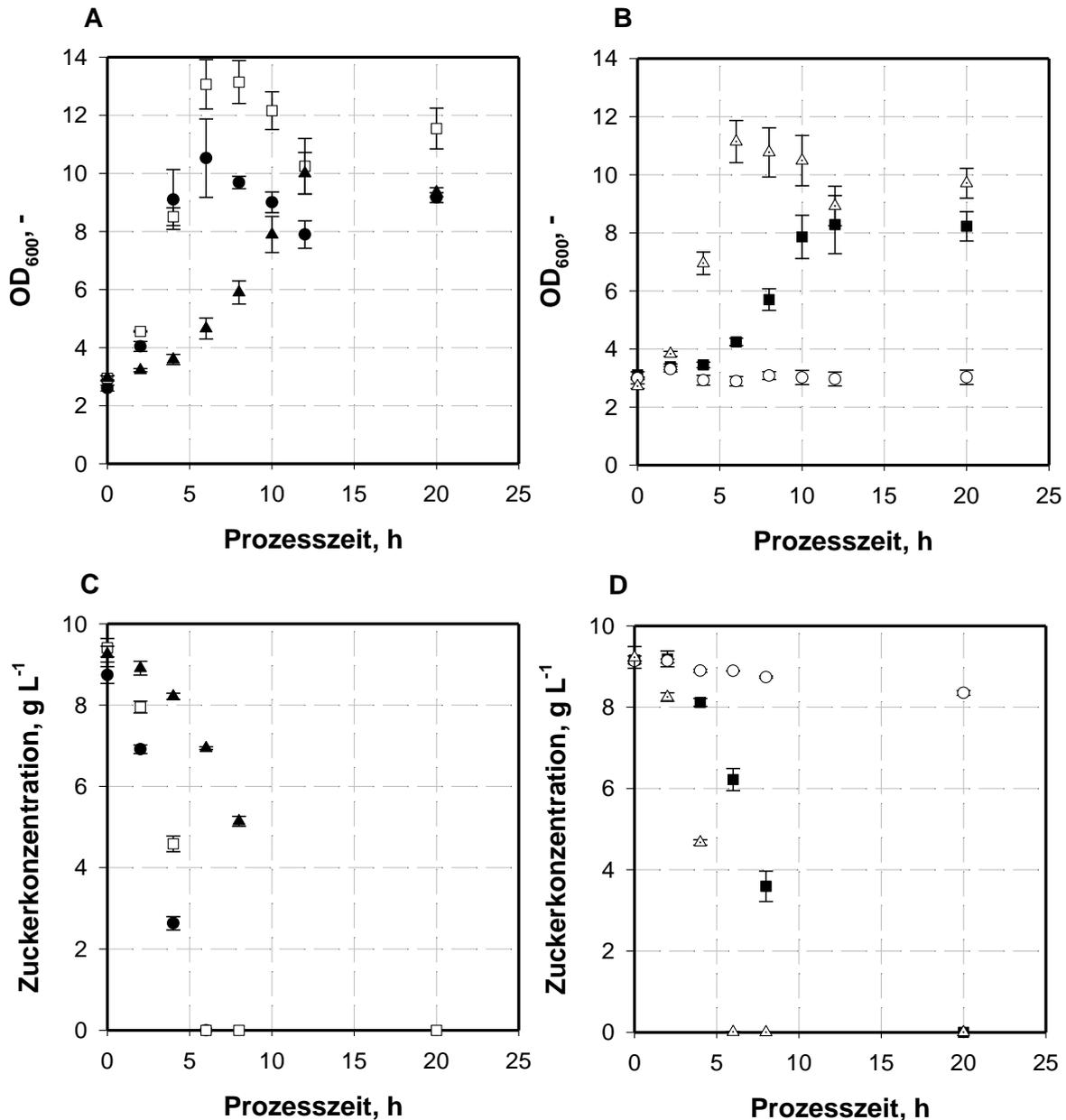


Abbildung 5.1: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) (A, B) und der Zuckerkonzentration (C, D) in parallelen Satzversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden $10 g L^{-1}$ Zucker vorgelegt; die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 L min^{-1} Reaktor^{-1}$ über 20 h. Folgende Zucker wurden eingesetzt: (●) Glucose, (□) Mannose, (▲) Galactose (links) und (■) Rhamnose, (○) Arabinose, (△) Xylose (rechts).

Der Verlauf der OD_{600} und der Zuckerkonzentration für Xylose gestaltet sich sehr ähnlich zu denen für Glucose und Mannose (Abbildung 5.1 B). Auch hier wird die maximale OD_{600} mit 10,8 nach 6 h Prozesszeit erreicht und im Medium keine Xylose mehr nach 4 h nachgewiesen. Für Rhamnose lässt sich eine Verzögerungsphase von 4 h erkennen, nach der ein exponentielles Wachstum bis 10 h stattfindet. Aufgrund des abnehmenden Wachstums und aufgrund von Daten der Gelöstsauerstoffkonzentration ist ein Verbrauch der Kohlenstoffquelle bei circa 10,2 h zu vermuten (Daten nicht gezeigt). Beim Einsatz von Arabinose als

Kohlenstoffquelle erfolgte keinerlei Zunahme der OD_{600} , das heißt kein Wachstum, sowie nur eine sehr geringe Abnahme der Zuckerkonzentration innerhalb von 20 h (Abbildung 5.1 B+D). Da auch in längeren Versuchen kein Verbrauch dieses Zuckers beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), kann daraus geschlossen werden, dass *T. oleaginosus* diesen Zucker nicht verstoffwechseln kann.

Substratverwertung von einem Zuckergemisch

Um Wachstum und Substratverwertung mit mehreren Zuckern zu untersuchen, wurden parallele Satzkultivierungen im Millilitermaßstab in definiertem Medium mit einem Zuckergemisch bestehend aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose und in Algenhydrolysat durchgeführt (siehe Abbildung 5.2).

In einem definierten Medium mit einem Zuckergemisch zeigen die Zellen ein exponentielles Wachstum nach einer Verzögerungsphase von circa 2 h bis 10 h Prozesszeit (Abbildung 5.2 A). Nach 12 h wird ein Maximalwert von 45,8 erreicht, ab dem das Wachstum stagniert. Danach nimmt die OD_{600} bis 24 h wieder leicht ab. Beim Vergleich der Verläufe der Zuckerkonzentration in Abbildung 5.2 C lässt sich anfangs eine simultane Abnahme der Glucose- und Mannosekonzentration erkennen. Die Galactosekonzentration bleibt die ersten 6 h nahezu konstant, anschließend wird Galactose aber gleichzeitig mit den Zuckern Glucose und Mannose durch *T. oleaginosus* aufgenommen. Da das Wachstum ab circa 12 h abflacht beziehungsweise stagniert, kann davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt die Kohlenstoffquelle aufgebraucht ist. Daten der gelösten Sauerstoffkonzentration deuten auf einen Verbrauch der Zucker nach 12,4 h hin (Daten nicht gezeigt).

Für Zellen, die in Algenhydrolysat gewachsen sind (Abbildung 5.2 B), wird eine deutlich höhere maximale OD_{600} von 62,8 gemessen. Diese liegt circa 30 % höher als bei Zellen, die in einem definierten Medium gewachsen sind (Abbildung 5.2 A), obwohl die Gesamtzuckerkonzentration im Algenhydrolysat um fast 50 % geringer war als im definierten Medium. Auch die Verwertung der Zucker im Algenhydrolysat erfolgt simultan (Abbildung 5.2 D). Obwohl das Wachstum im Algenhydrolysat nach 24 h stagniert, können zu diesem Zeitpunkt noch geringe Zuckerkonzentrationen im Medium nachgewiesen werden ($\sim 5,5 \text{ g L}^{-1}$). Nach 48 h sind jedoch alle Zucker aufgebraucht.

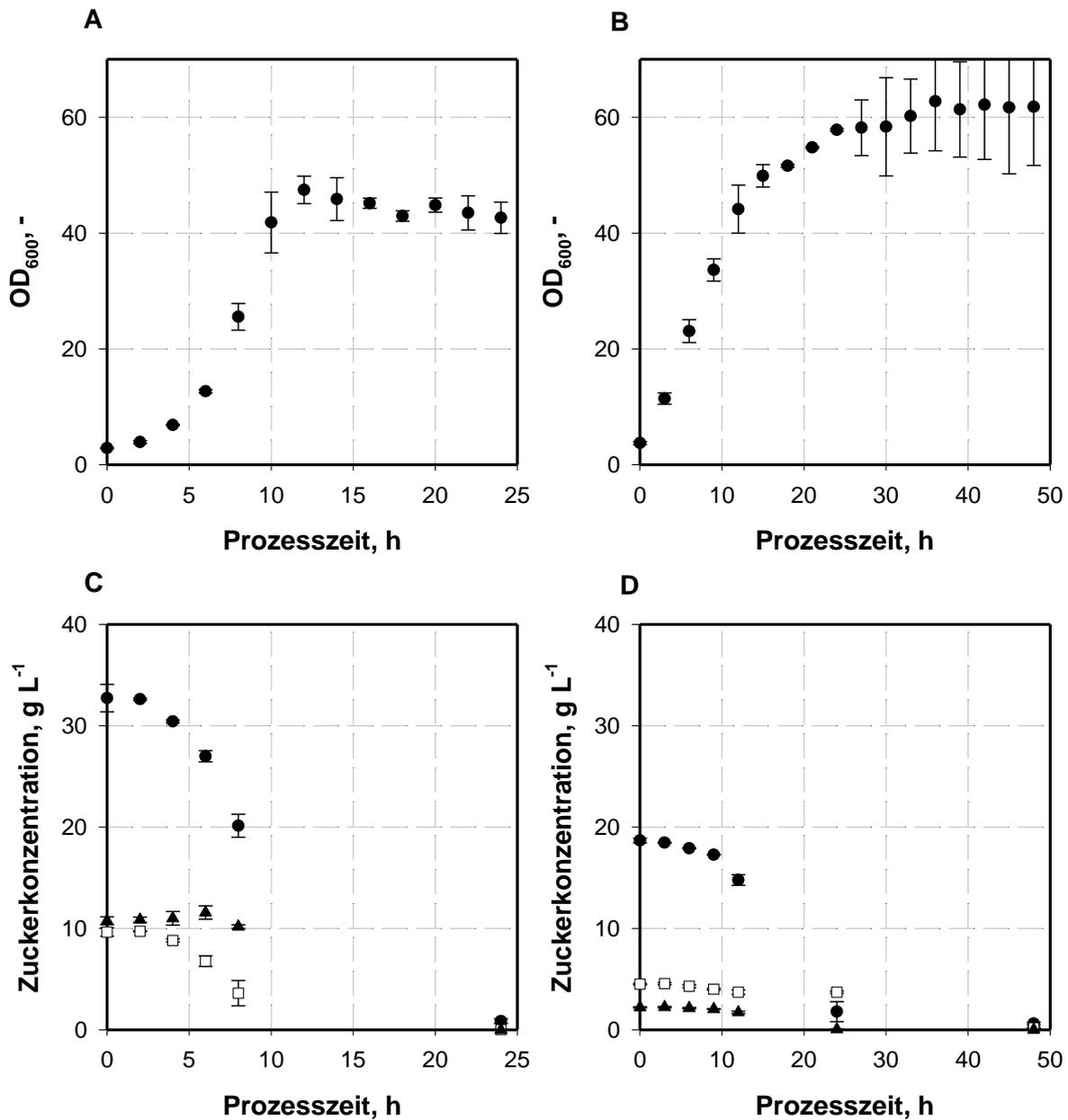


Abbildung 5.2: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) (A, B) und der Zuckerkonzentration (C, D) in parallelen Satzversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Links wurden 50 g L⁻¹ Zucker eines Zuckergemischs aus 60 % (w/w) Glucose (●), 20 % (w/w) Mannose (□) und 20 % (w/w) Galactose (▲) in einem definierten Medium (pH 6,5) vorgelegt; rechts wurde Algenhydrolysat als Fermentationsmedium eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ über 24 - 48 h.

Diskussion

Die Hefe *Trichosporon oleaginosus* zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus. So kann sie die Hexosen Glucose, Mannose, Galactose und Rhamnose sowie die Pentose Xylose verstoffwechseln und für Wachstum sowie Lipidbildung nutzen. Die Pentose Arabinose wird hingegen von *T. oleaginosus* nicht verstoffwechselt. Die resultierenden zellspezifischen Raten in der exponentiellen Wachstumsphase sowie die Dauer der Verzögerungsphase und die Biomasseausbeute sind vergleichend in Tabelle 5.1 und in Abbildung 5.3 dargestellt.

Tabelle 5.1: Übersicht über die erzielten maximalen Wachstumsraten μ_{\max} , die Dauer der Verzögerungsphasen, die maximalen spezifischen Substrataufnahmeraten $q_{S,\max}$ sowie der Biomasseausbeute Y_{XS} für *T. oleaginosus* aus Satzkultivierungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in definiertem Medium beziehungsweise in Algenhydrolysat. *Substrataufnahmerate für Gesamtzucker (n.b. = nicht bestimmt)

Zucker	μ_{\max} , h ⁻¹	Verzögerungsphase, h	$q_{S,\max}$, g g ⁻¹ h ⁻¹	Y_{XS} , g g ⁻¹
D-(+)-Glucose	0,243	0	0,59	0,50
D-(+)-Mannose	0,189	0	0,47	0,59
D-(+)-Galactose	0,091	2	0,31	0,42
L-(+)-Rhamnose	0,100	4	0,48	0,31
D-(+)-Xylose	0,167	0	0,60	0,50
L-(+)-Arabinose		Kein Wachstum		
Zuckergemisch	0,285	2	0,41*	0,39
Algenhydrolysat	0,200	0	n.b.	0,77

Die höchste maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} kann im definierten Medium für Glucose und das Zuckergemisch, sowie im komplexen Medium aus Algenhydrolysat erreicht werden. Für die Zucker Mannose und Xylose werden nur leicht niedrigere Wachstumsraten ermittelt. Wie auch in Abbildung 5.1 bereits ersichtlich, werden Galactose und Rhamnose erst verzögert aufgenommen, außerdem zeigt *T. oleaginosus* bei diesen Zuckern um bis zu 60 % niedrigere Wachstumsraten sowie Verzögerungsphasen bis zu 4 h. Die zellspezifischen Substrataufnahmeraten liegen für alle Zucker sehr hoch, wobei hier eine Präferenz für Glucose und Xylose zu erkennen ist.

Die Biomasseausbeuten zeigen ein ähnliches Bild und spiegeln ebenfalls die Beobachtungen aus Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2 wider und wurden zum Beispiel für Glucose und Xylose in der Literatur beschrieben (Evans und Ratledge, 1983a; Ykema et al., 1989; Yu et al., 2014). Pro Gramm verbrauchten Zucker werden im definierten Medium 0,31 - 0,59 g Biomasse gebildet. In Algenhydrolysat liegt die Biomasseausbeute mit 0,77 g g⁻¹ am höchsten. Da im Algenhydrolysat, was einem Medium mit vielen komplexen Bestandteilen entspricht, höhere OD₆₀₀-Werte und höhere Biomasseausbeuten als in einem definiertem Medium mit einem Zuckergemisch beobachtet werden, liegt die Vermutung nahe, dass hier das Wachstum von *T. oleaginosus* nicht nur durch Verwertung der vorhandenen Monosaccharide, sondern auch durch Verwertung komplexer Bestandteile wie Peptidreste erfolgt. So berichten beispielsweise Fakas et al. (2008) über eine erhöhte Glucoseaufnahme und stärkeres Wachstum für den Pilz *Cunninghamella echinulata* bei Präsenz von organischen Stickstoffresten im Medium.

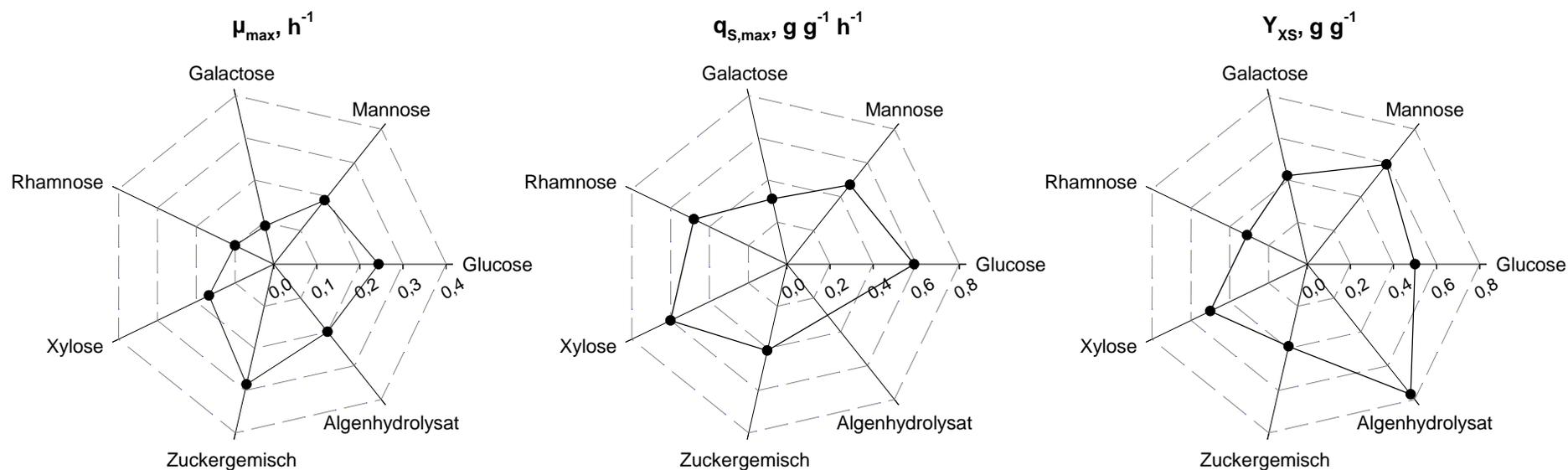


Abbildung 5.3: Vergleich der ermittelten maximalen, spezifischen Wachstumsraten μ_{max} , der maximalen, spezifischen Substrataufnahmeraten $q_{s,max}$ und der Biomasseausbeuten Y_{xs} von *T. oleagnosus* mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in definiertem Medium beziehungsweise in Algenhydrolysat.

Aufgrund des breiten Substratspektrums und der simultanen Zuckerverwertung eines Zuckergemischs eignet sich *T. oleaginosus* prinzipiell sehr gut für die Kultivierung mit Biomassehydrolysaten. Das Wachstum mit Algenhydrolysat als Substrat ist sehr gut, jedoch ist die Zuckerkonzentration in Algenhydrolysat mit $\sim 25 \text{ g L}^{-1}$ gering, sodass kein Zulaufprozess realisiert werden kann. Zudem ist der erzielte Lipidgehalt in Satzprozessen mit Algenhydrolysat als Medium mit 12 % sehr gering und bewegt sich im normalen Bereich für funktionelle Lipide (Ykema et al., 1986), da keine Nährstofflimitierung auftritt. Daher müssen für die erfolgreiche Lipidproduktion aus Algenhydrolysat alternative Methoden gefunden werden.

5.1.2 Lipidbildung

Um die Lipidproduktion mit verschiedenen Monosacchariden und einem Zuckergemisch (60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose, 20 % (w/w) Galactose) zu untersuchen, wurden Zulaufkultivierungen im Millilitermaßstab in einem definierten Medium bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur, pH 6,5 und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h durchgeführt (siehe Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5). Das C/N-Verhältnis im Satzmedium lag bei 15 g g^{-1} bei 20 g L^{-1} vorgelegtem Zucker, sodass die Lipidakkumulation durch eine Stickstofflimitierung nach spätestens 24 h induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Nach einer Satzphase von 6 h betrug die Zulauftrate $3,0 \text{ g}_{\text{Zucker}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h Prozesszeit und wurde anschließend halbiert.

Zu Beginn der Kultivierung nimmt die Gelöstsauerstoffkonzentration mit der Zeit ab, da die Zellen Sauerstoff zum Zellwachstum verbrauchen. Ab einer gewissen Prozesszeit erkennt man jedoch wieder eine Zunahme der Gelöstsauerstoffkonzentration. Bei Glucose, Mannose, Xylose und dem Zuckergemisch tritt dies nach circa 8,0 h auf, während bei Rhamnose nach 17,8 h und bei Galactose nach 20,7 h eine erneute Zunahme der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium zu beobachten ist.

Bei allen eingesetzten Zuckern kann zu Beginn der Kultivierung eine exponentielle Zunahme der OD_{600} beobachtet werden. Während bei Glucose, Mannose, Xylose und dem Zuckergemisch die Zellen bereits zwischen 6 h und 9 h in die Substratlimitierungsphase übergehen, kann dies bei Rhamnose erst nach circa 18 h und bei Galactose sogar erst nach 21 h gesehen werden. Somit findet der Übergang zwischen exponentiellem Wachstum und stationärer Wachstumsphase zeitgleich mit der erneuten Zunahme der Gelöstsauerstoffkonzentration statt, was auf eine auftretende Mediumlimitierung hindeutet. Für das Zuckergemisch kann die höchste OD_{600} von 82,1 gemessen werden, für Galactose wird die niedrigste OD_{600} von 45,6 notiert. Bei allen anderen Zuckern liegen die maximalen Werte zwischen 56 und 66.

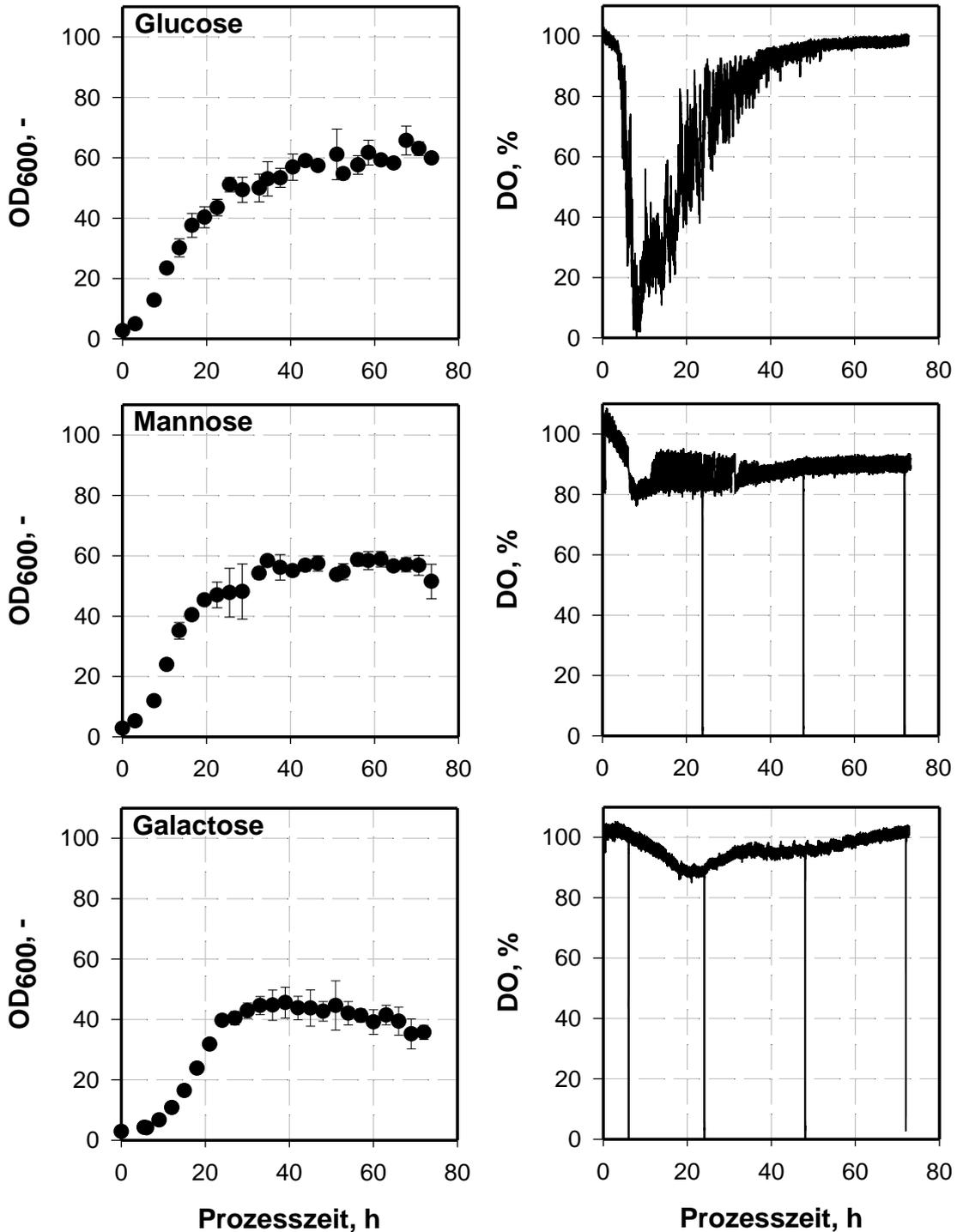


Abbildung 5.4: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) und der Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) in parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab mit Glucose, Mannose oder Galactose als Substrat. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} und pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h. Die Abnahme des DO nach 6 h, 24 h, 48 h und 72 h sind auf eine reduzierte Rührerdrehzahl bei der Probenahme beziehungsweise starker Schaumbildung (Glucose) zurückzuführen.

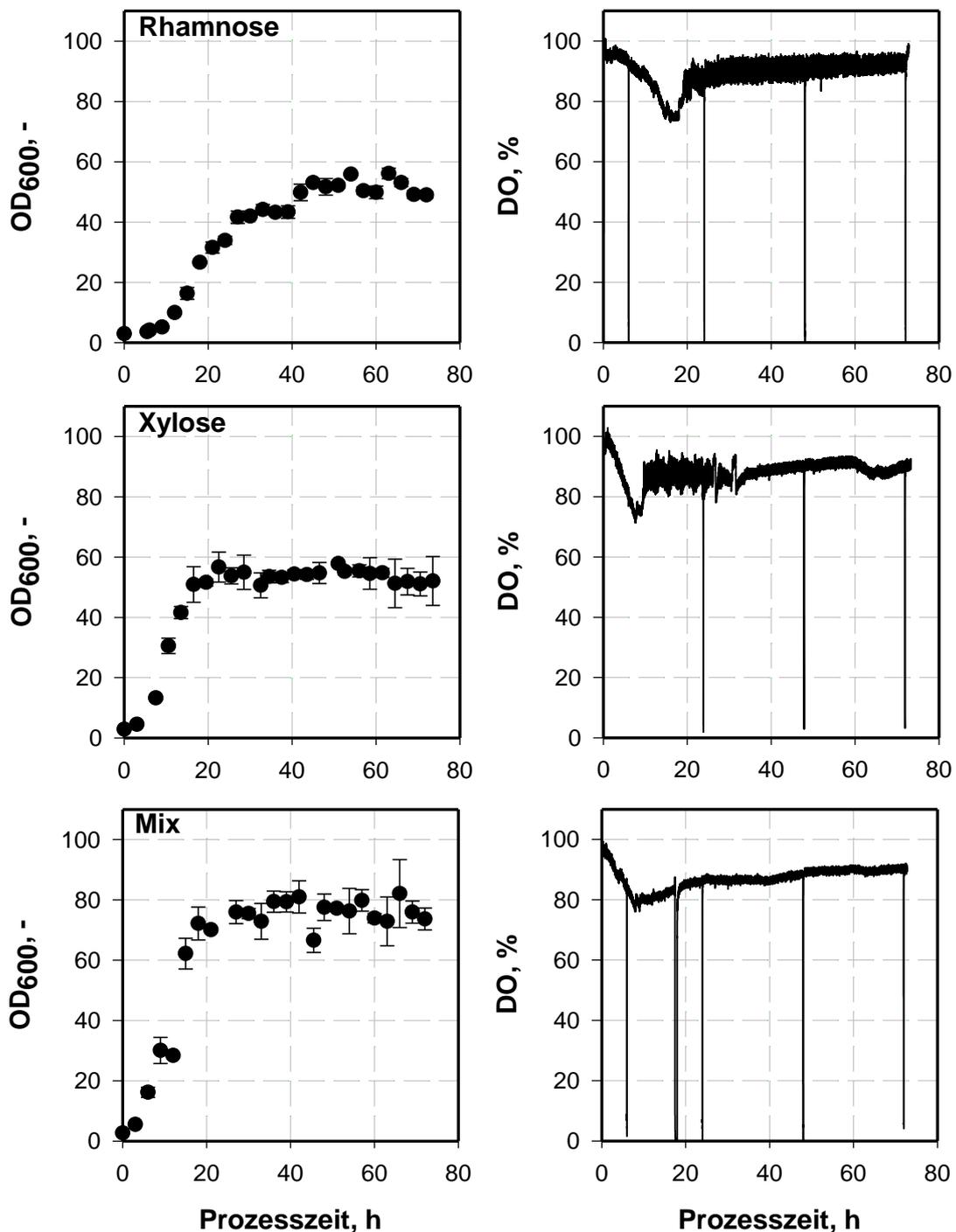


Abbildung 5.5: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) und der Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) in parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab mit Rhamnose, Xylose und einem Zuckergemisch (60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose, 20 % (w/w) Galactose) als Substrat. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} und pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h. Die Abnahme des DO nach 6 h, 24 h, 48 h und 72 h sind auf eine reduzierte Rührerdrehzahl bei der Probenahme zurückzuführen.

Abbildung 5.6 zeigt die erzielten Biomassenkonzentrationen, Lipidgehalte, Lipidausbeuten und Raum-Zeit-Ausbeuten der oben beschriebenen Zulaufkultivierungen im Millilitermaßstab. Die höchsten Biomassekonzentrationen ($35,5 - 35,9 \text{ g L}^{-1}$) können mit Glucose und dem Zuckergemisch erreicht werden. Für Mannose und Xylose werden ebenfalls ähnliche Biomassenkonzentrationen von $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$ erzielt, während bei Rhamnose und Galactose die geringste Konzentration ($\sim 18 \text{ g L}^{-1}$) gemessen werden.

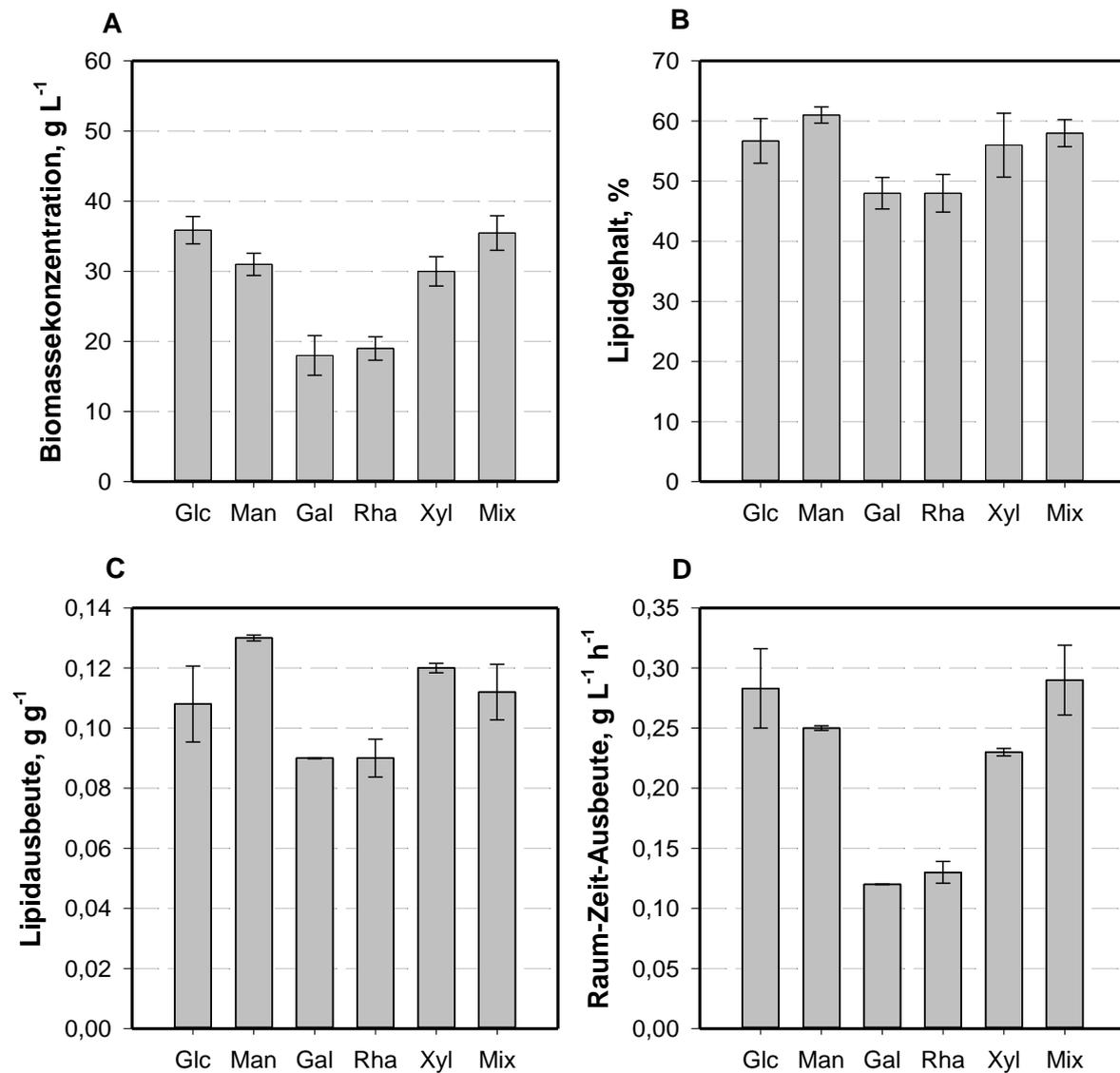


Abbildung 5.6: Finale Biomassekonzentrationen (A), Lipidgehalte (B), Lipidausbeuten (C) und Raum-Zeit-Ausbeuten (D) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} und pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h.

Für diese beiden Zucker ist auch der Lipidgehalt mit 48 % der niedrigste der untersuchten Zucker. Dies resultiert gleichzeitig in leicht geringeren Lipidausbeuten ($0,09 \text{ g g}^{-1}$) und deutlich niedrigeren Raum-Zeit-Ausbeuten ($0,12 - 0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Generell sind jedoch die Unterschiede zwischen den untersuchten Substraten sowohl beim Lipidgehalt (Abbildung 5.6 B) als auch bei

der Lipidausbeute (Abbildung 5.7 C) nicht signifikant, was anhand der Fehlerbalken verdeutlicht wird. Für Mannose wird zwar der höchste Lipidgehalt mit 61 % nach 72 h gemessen, aber auch bei den anderen Bedingungen werden Lipidgehalte von 56 - 58 % gemessen. Daher sind die abgeleiteten Lipidausbeuten ($0,11 - 0,13 \text{ g g}^{-1}$) und Raum-Zeit-Ausbeuten ($0,23 - 0,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ebenfalls sehr ähnlich. *T. oleaginosus* kann jede der untersuchten Pentosen und Hexosen, den sie zum Wachstum nutzen kann (siehe Kapitel 5.1.1), auch zur Lipidproduktion verwenden.

Diskussion

In Zulaufkultivierungen mit Einzelzuckern und einem Zuckergemisch unter stickstofflimitierenden Bedingungen konnten mit *T. oleaginosus* erfolgreich Lipide gebildet werden. Anhand des Verlaufs der Gelöstsauerstoffkonzentration (Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 rechts) lässt sich für jede Kultivierung gut der Zeitpunkt der eintretenden Stickstofflimitierung erkennen. Zu Beginn der Fermentation nimmt die Gelöstsauerstoffkonzentration mit der Zeit ab, da die Zellen Sauerstoff zum Zellwachstum verbrauchen. Sobald eine Limitierung im Medium auftritt, in diesem Fall die gewünschte Stickstofflimitierung, ändert sich der Stoffwechsel in den Zellen und diese verbrauchen weniger Sauerstoff. Daher steigt ab diesem Zeitpunkt die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wieder an. Damit lässt sich auch erkennen, dass die Zellen für die Lipidproduktion weniger Sauerstoff benötigen als für das Wachstum. Dieses Ergebnis wird auch in der Literatur beschrieben (Moreton et al., 1988; Ratledge und Wynn, 2002). Sauerstoff ist jedoch trotzdem essentiell für die Lipidproduktion und beeinflusst zum Beispiel die Fettsäurezusammensetzung (Davies et al., 1990) oder den Lipidgehalt (Yen und Zhang, 2011).

Die abgeleiteten Lipidausbeuten im Millilitermaßstab unter nicht optimierten Bedingungen, wie sie in Kapitel 5.1.2 beschrieben sind, sind für diese Hefe zum Teil vergleichbar mit publizierten Werten (Hassan et al., 1996; Meesters et al., 1996), liegen aber um den Faktor 2 unter veröffentlichten Werten für *Rhodospiridium toruloides* (Li et al., 2007; Zhao et al., 2011) oder *Cryptococcus curvatus* O3 (J. Zhang et al., 2011). Auch fast doppelt so hohe Raum-Zeit-Ausbeuten (bis $0,59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sind in oben genannten Publikationen beschrieben. Diese zwei Kennzahlen gilt es hinsichtlich einer effektiven Lipidproduktion, gerade aus regenerativen Rohstoffquellen wie Biomassehydrolysaten, mit *T. oleaginosus* noch zu verbessern.

5.2 *Cryptococcus curvatus*

Cryptococcus curvatus ist eine oleogene Hefe, die als Referenz für einen Vergleich zu *Trichosporon oleaginosus* ausgewählt wurde.

5.2.1 Wachstum

Substratverwertung von Einzelzuckern

In Satzprozessen mit 10 g L^{-1} Zucker und definiertem Medium wurde Wachstum und Substratverbrauch mit vier Hexosen (Galactose, Glucose, Mannose, Rhamnose) und zwei Pentosen (Arabinose, Xylose) untersucht. Durch Aufzeichnung der optischen Dichte (OD_{600}) und Bestimmung der Zuckerkonzentrationen zu definierten Probennahmezeitpunkten konnten die Substrataufnahmeraten, die maximalen Wachstumsraten und die Biomasseausbeuten berechnet werden. Die Zellen wurden im Millilitermaßstab über 24 h bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur, pH 6,5 und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ im Bioreaktorblock inkubiert. Die automatische Probennahme für die Messung der OD_{600} erfolgte alle 2 h, die manuelle Probennahme zur Messung der Zuckerkonzentrationen erfolgte alle 2 h bis 8 h Prozesszeit. Die Endprobe nach 24 h wurde des Weiteren für die Bestimmung der Biotrockenmasse genutzt.

Die OD_{600} für Glucose, Mannose und Xylose steigt im Vergleich zu der der Zucker Galactose, Arabinose und Rhamnose schneller an und erreicht höhere maximale Werte von 6 - 7 (Abbildung 5.7 A+B). Die OD_{600} für Galactose steigt erst nach einer Verzögerungsphase von circa 8 h, erreicht aber einen ebenso hohen Maximalwert wie für Glucose, Mannose und Xylose. Für Arabinose und Rhamnose ist der Verlauf der OD_{600} sehr ähnlich. Erst nach einer langen Verzögerungsphase von $\sim 18 \text{ h}$ beginnt die optische Dichte zu steigen. Es werden Maximalwerte von $\sim 3,5$ erreicht, die somit nur etwa halb so hoch liegen wie für die anderen Monosaccharide. Für Arabinose als Substrat fällt die OD_{600} zum Prozessende wieder.

Im Verlauf der Zuckerkonzentrationen ist eine fast identische Abnahme für Mannose und Glucose festzustellen, während die Aufnahme von Galactose deutlich langsamer geschieht (Abbildung 5.7 C). Auch die Pentose Xylose wird ähnlich schnell wie die Hexosen Mannose und Glucose verbraucht. Die Konzentrationen von Arabinose und Rhamnose sinken in den ersten 8 h nur leicht (Abbildung 5.7 D). Während alle anderen Zucker nach 24 h komplett verbraucht wurden, liegen am Ende noch $2,83 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose beziehungsweise $5,72 \text{ g L}^{-1}$ Rhamnose vor. *C. curvatus* kann alle untersuchten Monosaccharide, egal ob Pentose oder Hexose, verstoffwechseln.

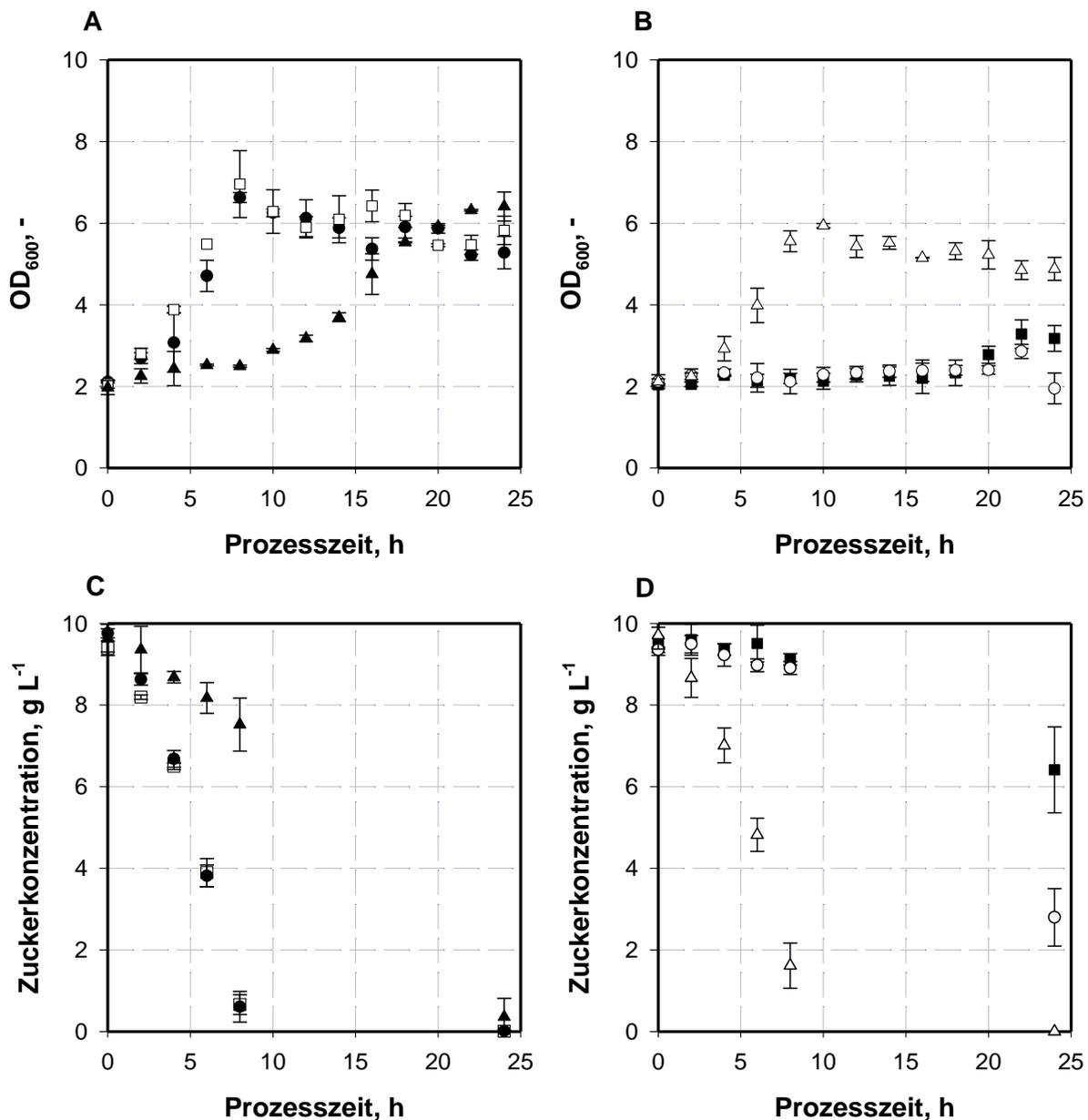


Abbildung 5.7: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) (A, B) und der Zuckerkonzentration (C, D) in parallelen Satzversuchen ($n = 3$) mit *C. curvatus* im Millilitermaßstab. Es wurden $10 g L^{-1}$ Zucker vorgelegt; die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 ^\circ C$ Reaktortemperatur, $20 ^\circ C$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 L min^{-1} Reaktor^{-1}$ über 24 h. Folgende Zucker wurden eingesetzt: (●) Glucose, (□) Mannose, (▲) Galactose (links) und (■) Rhamnose, (○) Arabinose, (Δ) Xylose (rechts).

Substratverwertung von einem Zuckergemisch

Um Wachstum und Substratverwertung mit mehreren Zuckern zu untersuchen, wurden parallele Satzkultivierungen im Millilitermaßstab in definiertem Medium mit einem Zuckergemisch bestehend aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose und mit Algenhydrolysat durchgeführt (Abbildung 5.8). Der Verlauf der OD_{600} unterscheidet sich deutlich zwischen den beiden Fermentationsmedien. Während im definierten Medium von Beginn an bis 10 h exponentielles Wachstum zu beobachten ist, zeigen die Zellen im Algenhydrolysat die ersten 4 - 6 h lineares Wachstum, was anschließend kurzzeitig exponentiell wird und danach wieder abflacht (siehe Abbildung 5.8 A+B). Die

maximale OD_{600} im definierten Medium liegt nach 10 h bei 11,4, wohingegen eine um den Faktor 2,3 höhere OD_{600} (26,6) nach 16 h im Algenhydrolysat gemessen wird. Im Algenhydrolysat liegt zu Beginn jedoch auch eine höhere Zuckerkonzentration als im definierten Medium vor (24,7 g L⁻¹ im Vergleich zu 20,4 g L⁻¹). Nach 10 h wurden im definierten Medium alle Zucker durch die Zellen verbraucht, weshalb auch das Wachstum ab diesem Zeitpunkt stagniert. Im Algenhydrolysat tritt derselbe Effekt erst nach 16 h auf. Aufgrund des Verlaufs der gelösten Sauerstoffkonzentration (Daten nicht gezeigt), wird ein Verbrauch der Zucker im Algenhydrolysat bei circa 16 h vermutet.

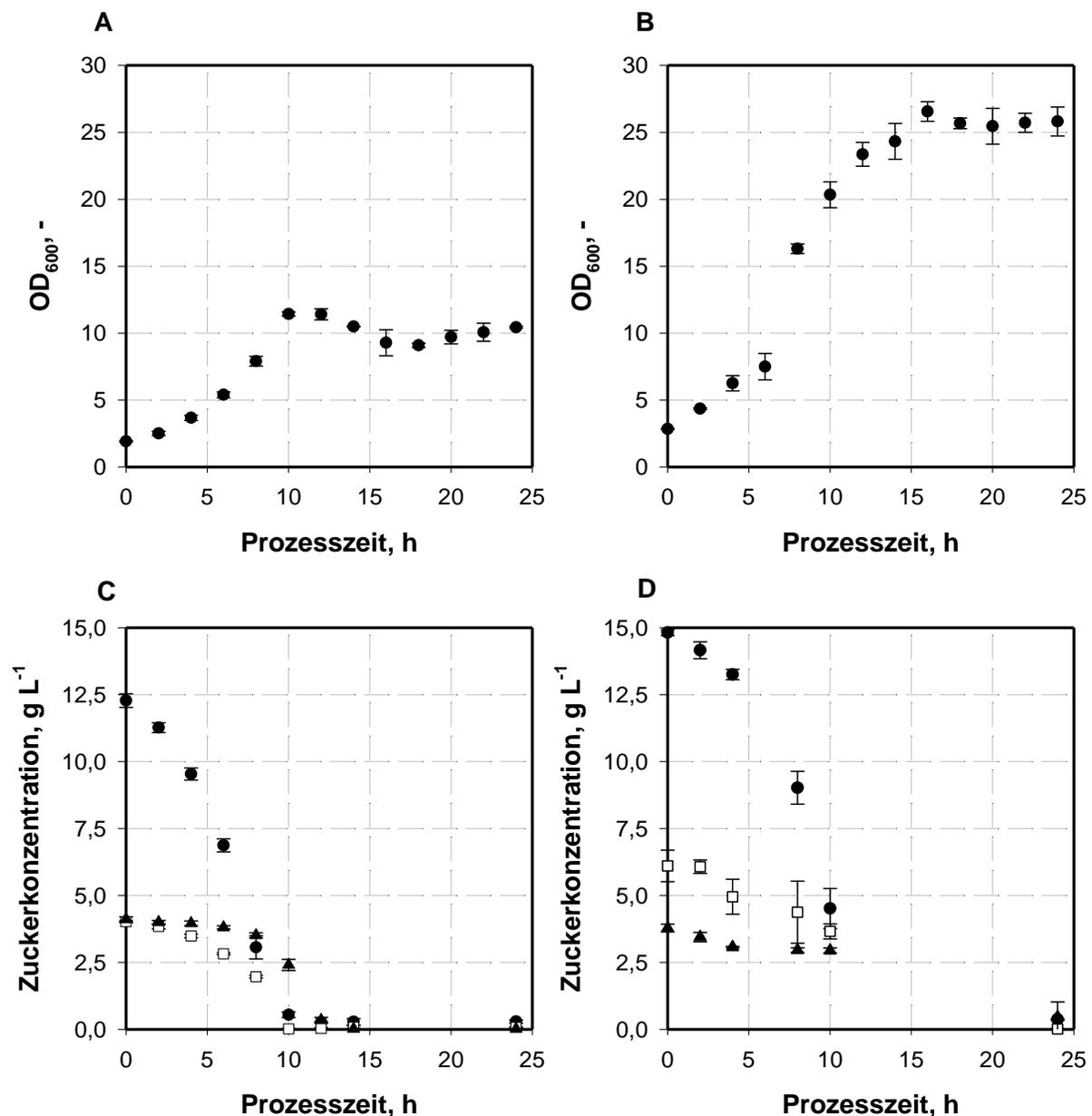


Abbildung 5.8: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) (A, B) und der Zuckerkonzentration (C, D) in parallelen Satzversuchen ($n = 3$) mit *C. curvatus* im Millilitermaßstab. Links wurden 20 g L⁻¹ Zucker eines Zuckergemischs aus 60 % (w/w) Glucose (●), 20 % (w/w) Mannose (□) und 20 % (w/w) Galactose (▲) in einem definierten Medium (pH 6,5) vorgelegt; rechts wurde Algenhydrolysat als Fermentationsmedium eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ über 24 h.

Anhand der Konzentrationsverläufe in Abbildung 5.8 C+D lässt sich erkennen, dass alle drei vorgelegten Zucker simultan durch *C. curvatus* verstoffwechselt werden. Während Glucose und Mannose von den Zellen von Beginn an aufgenommen werden, setzt der Galactoseverbrauch verzögert ein, findet dann aber zeitgleich mit den anderen Zuckern statt. Zudem wird Galactose in beiden Medien von der Zellen langsamer als Glucose und Mannose aufgenommen.

Diskussion

Die Hefe *Cryptococcus curvatus* zeichnet sich ebenfalls durch ein breites Substratspektrum aus. So kann sie die Hexosen Glucose, Mannose, Galactose und Rhamnose sowie die Pentosen Xylose und Arabinose verstoffwechseln und für ihr Wachstum nutzen. Die resultierenden zellspezifischen Raten in der exponentiellen Wachstumsphase sowie die Dauer der Verzögerungsphase und die Biomasseausbeuten sind vergleichend in Tabelle 5.2 und Abbildung 5.9 dargestellt. Vergleicht man die maximalen Wachstumsraten, die *C. curvatus* für die einzelnen Zucker aufweist, so spiegelt sich hier der in Abbildung 5.7 A+B dargestellte Trend wider. *C. curvatus* weist die höchsten, maximalen Wachstumsraten ($0,125 - 0,155 \text{ h}^{-1}$) mit den Zuckern Glucose, Mannose und Xylose auf. Die maximalen Wachstumsraten mit Galactose und Rhamnose liegen um fast 50 % darunter, die maximale Wachstumsrate mit Arabinose erreicht sogar nur 28 % des Maximalwerts. Die höchste maximale, spezifische Wachstumsrate ($0,200 \text{ h}^{-1}$) konnte in Algenhydrolysat, also einem Medium mit vielen komplexen Medienbestandteilen, erzielt werden. Auch in einem definierten Medium mit einem Zuckergemisch als Substrat wurde eine leicht höhere maximale Wachstumsrate gemessen als mit den Einzelzuckern.

Tabelle 5.2: Übersicht über die erzielten maximalen Wachstumsraten μ_{\max} , die Dauer der Verzögerungsphasen, die maximalen spezifischen Substrataufnahmeraten $q_{S,\max}$ sowie der Biomasseausbeute Y_{XS} für *C. curvatus* aus Satzkultivierungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in definiertem Medium beziehungsweise in Algenhydrolysat. *Substrataufnahmerate für Gesamtzucker (n.b. = nicht bestimmt)

Zucker	$\mu_{\max}, \text{h}^{-1}$	Verzögerungsphase, h	$q_{S,\max}, \text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$	$Y_{XS}, \text{g g}^{-1}$
D-(+)-Glucose	0,142	0	0,25	0,45
D-(+)-Mannose	0,155	0	0,21	0,56
D-(+)-Galactose	0,080	8	0,13	0,47
L-(+)-Rhamnose	0,085	18	0,06	(0,73)
D-(+)-Xylose	0,125	0	0,26	0,39
L-(+)-Arabinose	0,044	18	0,05	0,22
Zuckergemisch	0,182	0	0,28*	n.b.
Algenhydrolysat	0,200	0	0,36*	n.b.

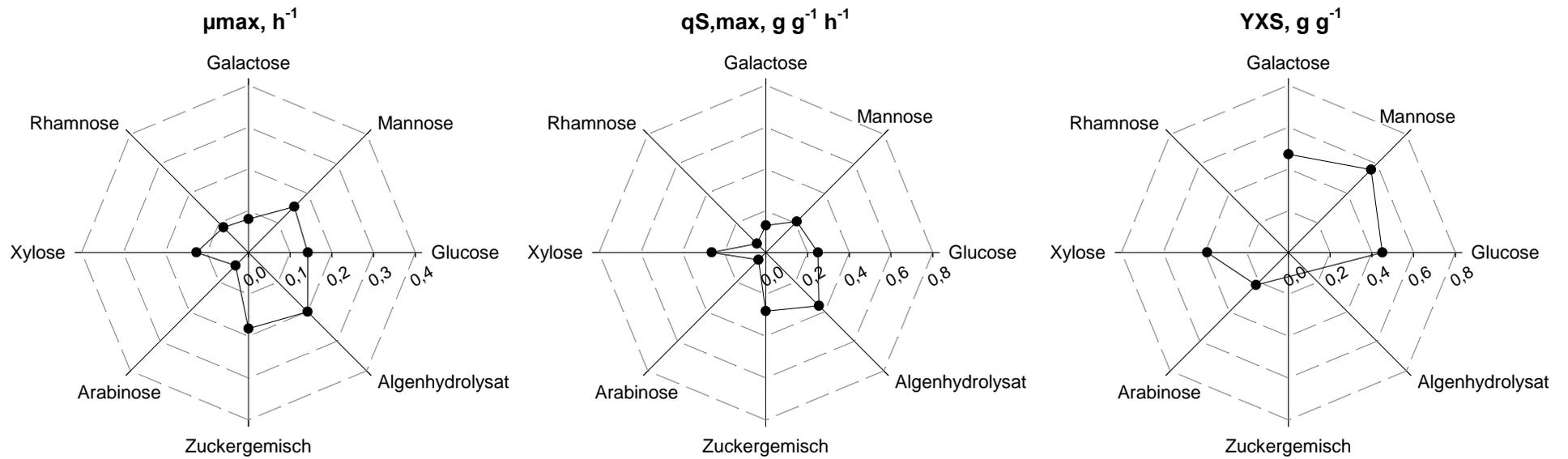


Abbildung 5.9: Vergleich der ermittelten maximalen, spezifischen Wachstumsraten μ_{max} , der maximalen, spezifischen Substrataufnahmeraten $q_{S,max}$ und der Biomasseausbeuten Y_{XS} von *C. curvatus* mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in definiertem Medium beziehungsweise in Algenhydrolysat.

Die höchste maximale spezifische Substrataufnahmerate $q_{S,max}$ wird mit Algenhydrolysat als Medium erzielt. Im Gegensatz zum definierten Medium, in dem nur anorganischer Stickstoff vorhanden ist, enthält das Algenhydrolysat auch organische Stickstoffquellen wie zum Beispiel Proteinreste. Dies könnte ein Grund für die verbesserte Aufnahme der Kohlenhydrate im Algenhydrolysat im Vergleich zum Zuckergemisch sein, bei dem die maximale, spezifische Substrataufnahmerate um fast 25 % geringer ist. Fakas et al. (2008) beschreiben dieses Phänomen für den Pilz *Cunninghamella echinulata* bei der Verwendung von Hydrolysat aus Tomatenabfällen.

Im definierten Medium werden für Xylose, Glucose, Mannose und das Zuckergemisch sehr ähnliche Substrataufnahmeraten gemessen, die jedoch immer um ein Drittel niedriger sind als im Algenhydrolysat. Betrachtet man die anderen drei Zucker, lässt sich erkennen, dass Arabinose und Rhamnose am langsamsten verstoffwechselt werden. Die Raten sind um den Faktor 5 geringer als mit Xylose. Die maximale spezifische Substrataufnahmerate für Galactose liegt um 50 % niedriger als die Raten für Glucose und Xylose. Mit Glucose, Mannose oder Xylose konnte keine Verzögerungsphase im Wachstum beobachtet werden, während bei den anderen Zuckern deutliche Verzögerungsphasen auftreten. Die Unterschiede in den gemessenen Raten könnten zum Beispiel auf unterschiedliche Transport- und Stoffwechselmechanismen für die verschiedenen Zucker zurückzuführen sein. So berichten Knoshaug et al. (2009) für verschiedene Hefen verschiedene Transportsysteme für die Hexose Arabinose. Zudem deuten die Verzögerungsphasen bei Galactose, Rhamnose und Arabinose darauf hin, dass möglicherweise in der Hefe erst Transportenzyme (Rhamnose, Arabinose) oder Enzyme zur Stoffumwandlung (Galactose) exprimiert werden müssen.

Für Arabinose zeigt sich ein deutlich langsames Wachstum, das Auftreten einer Verzögerungsphase sowie eine geringere spezifische Substrataufnahmerate und Biomasseausbeute als für die Pentose Xylose. Dies ist auch für die oleogene Hefe *Rhodospordium toruloides* in der Literatur beschrieben (Wiebe et al., 2012). Für den hier untersuchten Hefestamm wurde in einer anderen Studie nur ein sehr geringer Arabinoseverbrauch von <10 % des Ausgangszuckers beschrieben (Knoshaug et al., 2009). In dieser Studie wurde jedoch eine breite Durchmusterung von 165 Stämmen vorgenommen und anhand von einfachen Satzversuchen die Hefen nach ihrer Arabinose-Stoffwechselaktivität grob kategorisiert.

Die Biomasseausbeuten für die anderen Zucker liegen zwischen $0,39 \text{ g g}^{-1}$ und $0,56 \text{ g g}^{-1}$ (ausgenommen Rhamnose) und sind damit ähnlich wie für die Ölhefen *Rhodospordium toruloides* (Wiebe et al., 2012), *Candida curvata* D (heute: *Trichosporon oleaginosus*) (Evans und Ratledge, 1983a) und *Rhodotorula sp.* (Enshaeieh et al., 2012). Eine Biomasseausbeute von $0,73 \text{ g g}^{-1}$, wie für Rhamnose berechnet, würde indes bedeuten, dass fast dreiviertel des aufgenommenen Zuckers für Biomasseaufbau verwendet wird. Dies ist so nicht realistisch und

daher muss dieser Wert mit Vorsicht betrachtet werden. Da sowohl Arabinose als auch Rhamnose erst stark verzögert aufgenommen werden, sind nur sehr wenige Messpunkte vorhanden, die den tatsächlichen Substratverbrauch zeigen, was zu einer ungenauen Bestimmung der Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeuten führen kann.

5.2.2 Lipidbildung

Lipidbildung im Millilitermaßstab

Anschließend wurde die Produktbildung von *C. curvatus* im Millilitermaßstab untersucht, indem zum einen die Lipidbildung mit Glucose als Substrat bei drei verschiedenen pH gemessen wurde und zum anderen beim als optimal identifizierten pH zusätzlich die Lipidbildung aus einem Zuckergemisch betrachtet wurde (Abbildung 5.10). Die Zellen wurden dazu in Zulaufkultivierungen in definiertem Medium bei 30°C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur, 2800 rpm und 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ Begasung für 96 h kultiviert. Das C/N-Verhältnis im Satzmedium lag bei 15 g g⁻¹ (bei 20 g L⁻¹ vorgelegtem Zucker), sodass die Lipidakkumulation durch eine Stickstofflimitierung nach spätestens 24 h induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Nach einer Satzphase von 6 h betrug die Zulauftrate 2,91 g_{Zucker} L⁻¹ h⁻¹ bis 24 h Prozesszeit und wurde anschließend halbiert. Die Zulaufraten für das Zuckergemisch betragen indes nur jeweils die halbe Rate wie für Glucose, da statt eines Zulaufmediums mit 500 g L⁻¹ Zucker nur ein Zulaufmedium mit 250 g L⁻¹ bei identischem Volumenstrom verwendet wurde. Um einen konstanten pH während des gesamten Prozesses zu realisieren, musste das definierte Medium mit 1 M MES-Puffer (2-N-Morpholino-Ethansulfonsäure-Puffer) gepuffert werden. Aufgrund der vorhandenen Ausstattung des Bioreaktorblocks (pH-Sensorspots arbeiten nur bis zu einem pH von 6,5) erfolgte die pH-Messung alle 24 h manuell und gegebenenfalls wurde der pH mit 1 M KOH korrigiert.

Bei den erzielten Biomassekonzentrationen wurden die höchsten Werte mit Glucose bei pH 5,0 erreicht (35,4 g L⁻¹), für pH 5,5 und pH 6,0 wurden ähnliche Werte gemessen (31,0 - 31,4 g L⁻¹). Unter Einbezug der dargestellten Standardabweichungen kann hier kein signifikanter Unterschied für die Biomassekonzentration im untersuchten pH-Bereich festgestellt werden. Bei der Kultivierung mit dem Zuckergemisch wurde interessanterweise die geringste Biomassekonzentration von 21,1 g L⁻¹ erreicht, jedoch der höchste Lipidgehalt von 23 %. Bei den gemessenen Lipidgehalten lässt sich eine leichte Präferenz für pH 5,5 zur Lipidbildung herauslesen, denn hier wurde der höchste Lipidgehalt mit 17 % bei den drei untersuchten pH gemessen. Daraus ergibt sich auch die höchste Lipidkonzentration mit 5,4 g L⁻¹ bei pH 5,5, sowie die höchste Raum-Zeit-Ausbeute von 0,057 g L⁻¹ h⁻¹. Die Standardabweichungen sind jedoch vor allem bei den berechneten Lipidkonzentrationen und folglich bei den Raum-Zeit-Ausbeuten relativ groß, so dass bei der Lipidproduktion mit *C. curvatus* keine deutliche Präferenz zu erkennen ist. Da die Zuckerkonzentration nicht *at-*

line gemessen wurde, wurde erst im Anschluss festgestellt, dass durch die eingestellten Zulaufraten eine Zuckerakkumulation im Medium von 80 - 100 g L⁻¹ nach 96 h bei Glucose stattfand (Daten nicht gezeigt). Für das Gemisch lag die Gesamtzuckerkonzentration nach 96 h jedoch nur bei 25 g L⁻¹ (Daten nicht gezeigt).

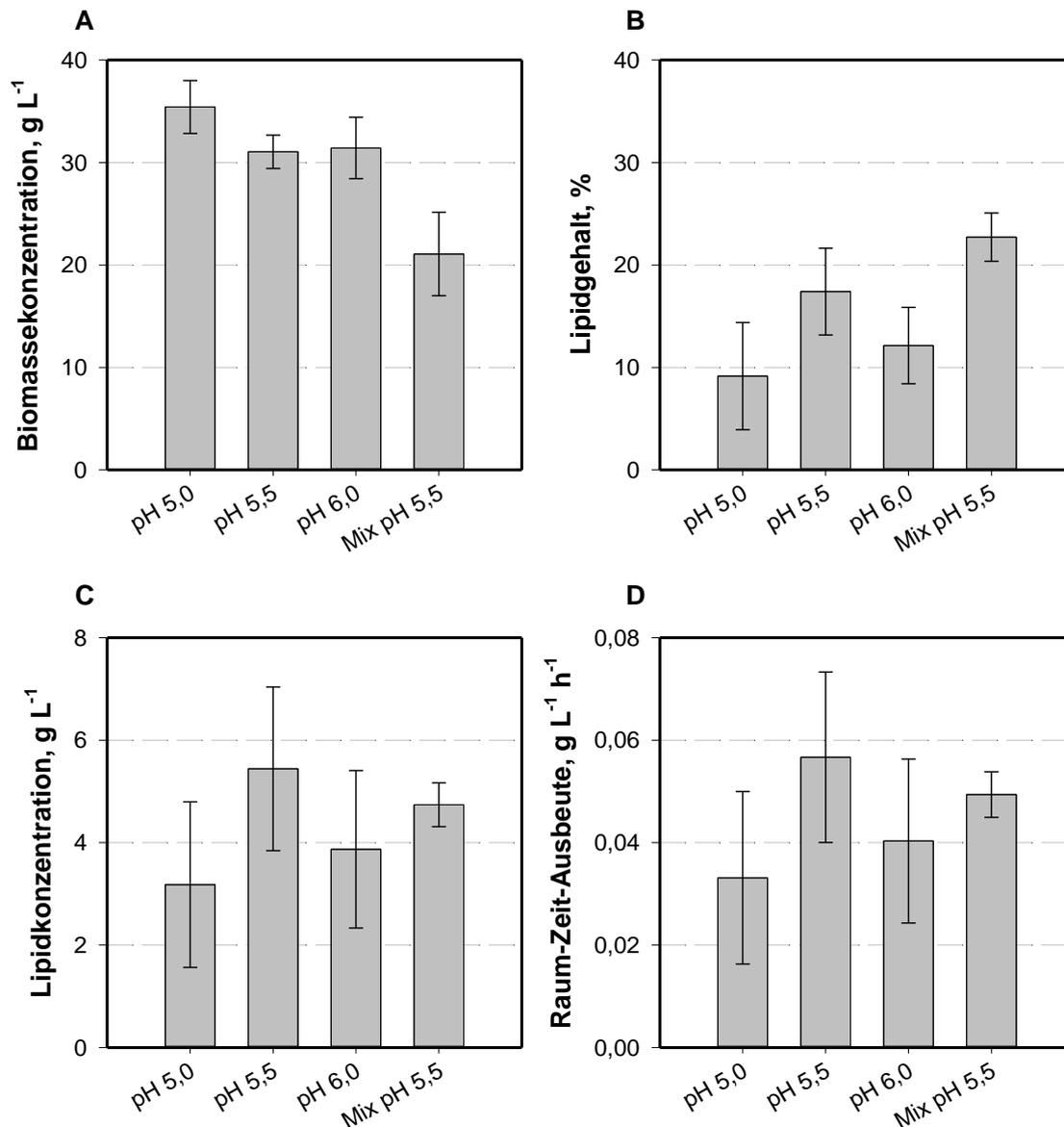


Abbildung 5.10: Finale Biomassekonzentrationen (A), Lipidgehalte (B), Lipidkonzentrationen (C) und Raum-Zeit-Ausbeuten (D) aus parallelen Zulaufversuchen (n = 3) mit *C. curvatus* im Millilitermaßstab. Es wurden 20 g L⁻¹ Zucker (Glucose oder ein Zuckergemisch (Mix) aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose) in einem definierten Medium mit 1 M MES-Puffer vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von 2,91 g L⁻¹ h⁻¹ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ über 96 h. Es wurden drei verschiedene pH für die Lipidbildung mit Glucose untersucht.

Lipidbildung im Litermaßstab

Der im Millilitermaßstab identifizierte optimale pH von 5,5 wurde bei einer Zulaufkultivierung mit Glucose als Substrat im Litermaßstab übernommen. Des Weiteren wurde bei 1000 rpm, 2 L min⁻¹ Luftbegasung und 30 °C über 150 h kultiviert. Auch die ursprünglichen Zulaufdaten

von $2,91 \text{ g}_{\text{Zucker}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h Prozesszeit und anschließend $1,455 \text{ g}_{\text{Zucker}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurden beibehalten. Aufgrund starker Zuckerakkumulation, die im Medium nachgewiesen wurde (Abbildung 5.11 D), wurde nach 53,75 h der Glucosezulauf gestoppt und wieder auf Satzbetrieb umgestellt.

Die Zunahme der lipidfreien Biomassekonzentration (Abbildung 5.11 A) erfolgt in den ersten 9 h exponentiell, solange genug Glucose und Ammonium (Abbildung 5.11 D+E) im Medium vorhanden ist. Die lipidfreie Biomassekonzentration erreicht nach 30 h ihr Maximum mit $22,6 \text{ g L}^{-1}$ und pendelt sich zum Ende der Kultivierung nach 150 h bei $15 - 17 \text{ g L}^{-1}$ ein. Zwischen 24 h und 72 h streuen die Werte stark um 20 g L^{-1} , was auch auf Ungenauigkeiten bei der Probenaufarbeitung zurückgeführt werden kann, da die Zellen aufgrund hoher Viskosität schwieriger zu pipettieren waren. Da nach 24 h kein Ammonium im Medium mehr nachgewiesen werden konnte, stagniert das Wachstum ab diesem Zeitpunkt. Zudem kann ab 24 h eine lineare Zunahme des Lipidgehalts auf 59 % sowie der Lipidkonzentration auf $23,1 \text{ g L}^{-1}$ (Lipidproduktionsrate: $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bis zum Kultivierungsende beobachtet werden, was ebenfalls auf die Stickstofflimitierung im Medium zurückzuführen ist. Die Glucosekonzentration (Abbildung 5.11 D) nimmt ab Zulaufbeginn kontinuierlich zu und zeigt nach Umstellen auf den Satzbetrieb eine lineare Abnahme mit einer Rate von $0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute wird nach 150 h erreicht und liegt bei $0,154 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach 150 h konnte die Kohlenstoffbilanz zu 97 % geschlossen werden.

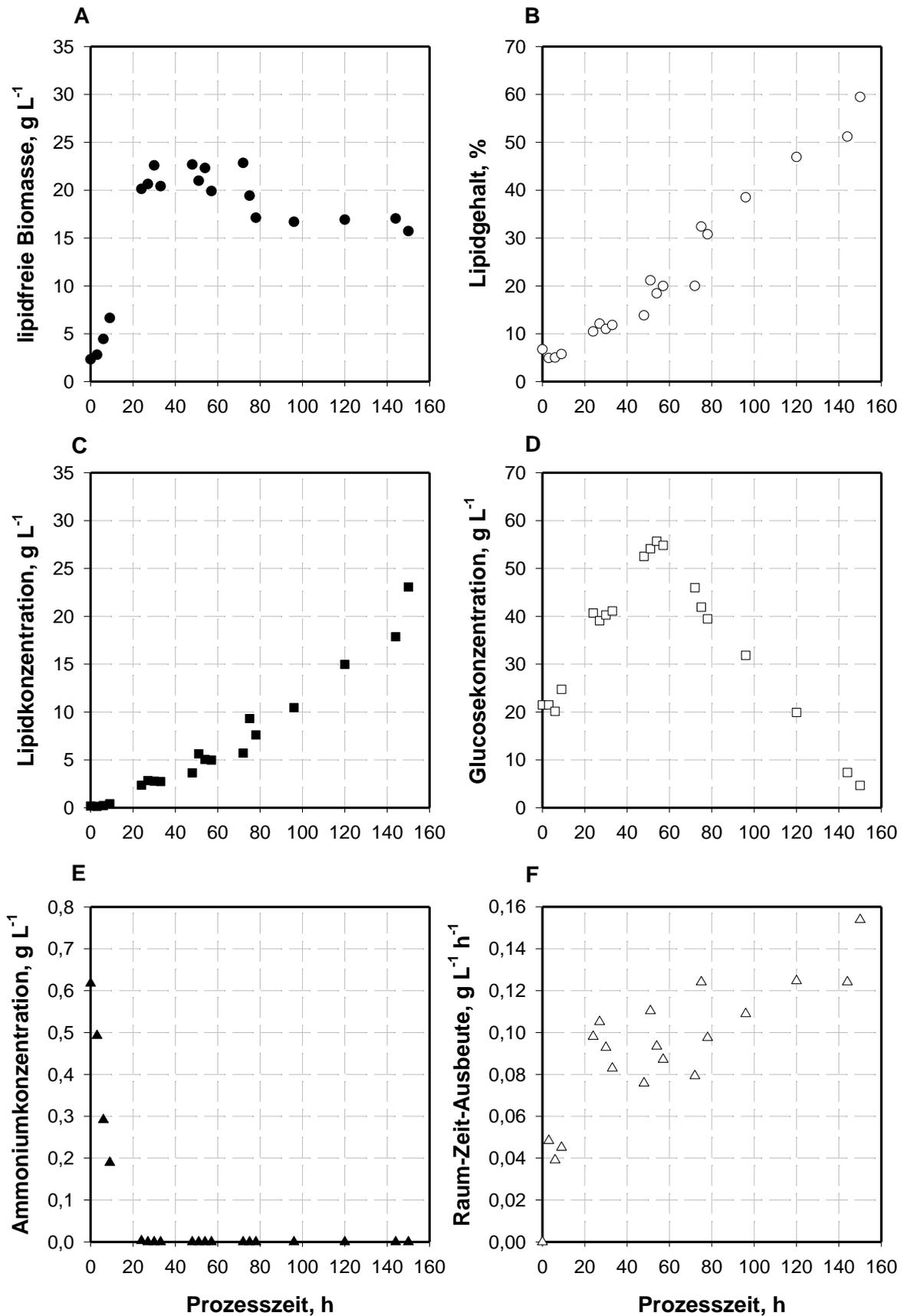


Abbildung 5.11: Lipidfreie Biomassekonzentration (A), Lipidgehalt (B), Lipidkonzentration (C), Glucosekonzentration (D), Ammoniumkonzentration (E) und Raum-Zeit-Ausbeute (F) aus einem Zulaufprozess mit *C. curvatus* im Litermaßstab. Es wurden 20 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei 800 rpm , $30 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Begasungsrate von 2 L min^{-1} über 150 h . Die Zulaufsraten betragen $2,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen $6 - 24 \text{ h}$ und $1,455 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen $24 - 53,75 \text{ h}$, davor und danach erfolgte ein Satzbetrieb.

Diskussion

Bei der Lipidbildung von *C. curvatus* ist generell anzumerken, dass die gemessenen Lipidgehalte im Millilitermaßstab eher als gering einzustufen sind, vor allem in Anbetracht der in Kapitel 3.3.1 präsentierten allgemeinen Definition, der zufolge oleogene Hefen mehr als 20 % ihrer Biotrockenmasse in Form von Lipiden einlagern können. Da die vorgelegte Stickstoffquelle nach 24 h verbraucht war (Daten nicht gezeigt), blieben den Zellen mindestens 72 h zur Einlagerung von Lipiden. Nachdem keine weiteren Untersuchungen zum Beispiel bezüglich des Einflusses von sehr hohen Substratkonzentrationen auf die Lipidbildung vorgenommen wurden, lässt sich hier nur spekulieren, dass dies ein möglicher Grund für die geringen Lipidgehalte ist. Ein weiteres Indiz hierfür ist der höhere Lipidgehalt, der mit dem Zuckergemisch erreicht wurde, bei dem die Substratkonzentration nie über 25 g L^{-1} stieg. Für andere oleogene Hefen wie *Rhodospodium toruloides* oder *Cryptococcus curvatus* O3 wird eine Substratüberschussinhibierung ab Konzentrationen von 150 g L^{-1} beziehungsweise 60 g L^{-1} berichtet (Li et al., 2007; J. Zhang et al., 2011).

C. curvatus zeigt für die Lipidbildung eine geringe Tendenz für einen leicht sauren pH von 5,5, was auch für andere Hefen häufig berichtet wird (zum Beispiel Ageitos et al., 2011; Davies, 1988; Papanikolaou und Aggelis, 2011). Allgemein werden für Hefen Reaktionsbedingungen im leicht sauren pH empfohlen (Feldmann, 2010).

Wird die Lipidbildung durch *C. curvatus* mit Glucose als Substrat über einen längeren Zeitraum von 150 h im Litermaßstab betrachtet, so ist deutlich zu erkennen, dass nicht nur am Ende des Prozesses nach 150 h mit 59 % ein höherer Lipidgehalt als im Millilitermaßstab erreicht wurde, sondern auch bereits nach 96 h (39 % im Vergleich zu 17 %). Da im Litermaßstab die Glucosekonzentration nicht höher als $55,7 \text{ g L}^{-1}$ war (im Vergleich zu fast 100 g L^{-1} im Millilitermaßstab nach 96 h), deutet dies auf die oben erwähnte Hemmung der Lipidproduktion durch zu hohe Substratkonzentration hin. Die Biomassekonzentration liegt in beiden Maßstäben in einem ähnlichen Bereich nach 96 h ($27,2 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $31,1 \pm 1,6 \text{ g L}^{-1}$), wobei die Biomasseausbeute $Y_{X,S,\mu}$ während des unlimitierten Wachstums im Litermaßstab um 50 % höher liegt als im Millilitermaßstab. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute für die Lipidproduktion mit *C. curvatus* ist mit $0,154 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nicht sonderlich hoch. Für andere oleogene Hefen wie *Rhodospodium toruloides* oder *Yarrowia lipolytica* werden deutlich höhere Produktivitäten von $0,54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ berichtet (Li et al., 2007; Tai und Stephanopoulos, 2012). Die dort genannten Lipidausbeuten von $0,23 \text{ g g}^{-1}$ beziehungsweise $0,27 \text{ g g}^{-1}$ liegen ebenso über der für *C. curvatus* erzielten Lipidausbeute von $0,18 \text{ g g}^{-1}$ für die gesamte Kultivierung. Betrachtet man nur die Lipidbildungsphase, so erhält man jedoch für *C. curvatus* im Litermaßstab eine Lipidausbeute von $0,28 \text{ g g}^{-1}$, die somit nur etwas unter der maximal möglichen Lipidausbeute aus Glucose von $0,33 \text{ g g}^{-1}$ liegt (Moreton

et al., 1988; Ratledge und Cohen, 2008). Die maximale, spezifische Lipidbildungsrate q_L wurde auf $0,008 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in Kapitel 5.2.1 und 5.2.2 gezeigte simultane Verbrauch der Hexosen Glucose, Mannose und Galactose zur Lipidproduktion einen vielfältigen Einsatz der Hefe *Cryptococcus curvatus* wie zum Beispiel zur Verwertung von Biomasseabfallstoffen ermöglicht. Jedoch zeigt sich anhand der gemessenen Raum-Zeit-Ausbeute, die um den Faktor 3,5 geringer ist als publizierte Werte und ebenso fast um den Faktor 2 niedriger als für die in Kapitel 5.1.2 gezeigten Hefe *T. oleaginosus*, dass die Lipidproduktion mit dieser Hefe nicht ausreichend ist für eine industrielle Anwendung. In den folgenden Kapiteln werden daher nur weitere experimentelle Untersuchungen mit *T. oleaginosus* präsentiert.

6 Lipidproduktion mit *Trichosporon oleaginosus*

Im folgenden Kapitel werden zuerst neben dem Anwenden einer Stickstofflimitierung, welche in der Literatur als Standard zur Induktion der Lipidakkumulation beschrieben wird (Beopoulos et al., 2011), der Einfluss einer Schwefel- sowie Phosphorlimitierung auf die Lipidproduktion betrachtet. Des Weiteren wird der Einfluss des pH auf die Lipidproduktion der oleogenen Hefe *Trichosporon oleaginosus* untersucht. Abschließend werden Zulaufprozesse zur Produktion von Lipiden im Milliliter- und Litermaßstab verglichen.

6.1 Einfluss des C/N-Verhältnisses

Der Einfluss des C/N-Verhältnisses im vorgelegten Medium und im Zulaufmedium auf die Lipidbildung von *T. oleaginosus* mit Glucose als Substrat wurde in Zulaufkultivierungen im Millilitermaßstab untersucht. Die Zulaufzeiten (4 g L⁻¹ h⁻¹ von 6 h bis 24 h, 4 g L⁻¹ h⁻¹ von 24 h bis 72 h) wurden aufgrund früherer Versuche entsprechend gewählt, da so eine ausreichende, aber nicht übermäßige Versorgung der Zellen mit Glucose möglich war. Die gewählten C/N-Verhältnisse im Satzmedium stehen dabei für Ammoniumsulfatkonzentrationen von 1,89 g L⁻¹ bis 7,54 g L⁻¹ bei 20 g L⁻¹ Satzglucose. Im Zulaufmedium lagen 400 g L⁻¹ Glucose vor bei Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0 g L⁻¹ bis 30,18 g L⁻¹, welche C/N-Verhältnisse bis zu 25 g g⁻¹ im Zulaufmedium widerspiegeln. Ergebnisse zum Einfluss des C/N-Verhältnisses auf Wachstum und Lipidproduktion sind in Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2 dargestellt.

Abbildung 6.1 zeigt die finalen Biomasse- und Lipidkonzentrationen (A) sowie Lipidgehalte (B) bei verschiedenen C/N-Verhältnissen im Satzmedium und reiner Glucoselösung als Zulaufmedium. Je niedriger das C/N-Verhältnis im Satzmedium, desto mehr Biomasse wurde tendenziell gebildet. Die Lipidkonzentration blieb indes fast identisch bei ~20 g L⁻¹. Aufgrund der teils großen Fehlerbalken können keine signifikanten Unterschiede für die gemessenen Lipidgehalte bei den verschiedenen C/N-Verhältnissen im Satzmedium festgestellt werden. Da nur die Menge an verfügbarer Stickstoffquelle variierte und die Kohlenstoffquelle immer im Überschuss vorlag (je niedriger das C/N-Verhältnis, desto mehr Ammoniumsulfat lag bei gleicher Menge Glucose vor), konnte in Kultivierungen mit niedrigem C/N-Verhältnis mehr Biomasse gebildet werden, da die Zellen länger unlimitiert wuchsen. Geht man von einer konstanten zellspezifischen Ammoniumaufnahme q_{NH_4} aus, was bei Annahme einer Sättigungskinetik unter nicht limitierenden und nicht inhibierenden Ammoniumkonzentrationen der Fall ist, tritt eine Stickstofflimitierung im Medium bei höheren C/N-Verhältnissen früher auf. Damit bleibt den Zellen bei gleicher Prozesszeit theoretisch mehr Zeit zur Lipideinlagerung. Bei genügend langer Prozesszeit zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr in den Lipidgehalten mit zunehmendem C/N-Verhältnis im Satzmedium, was in Abbildung 6.1 B zu sehen ist.

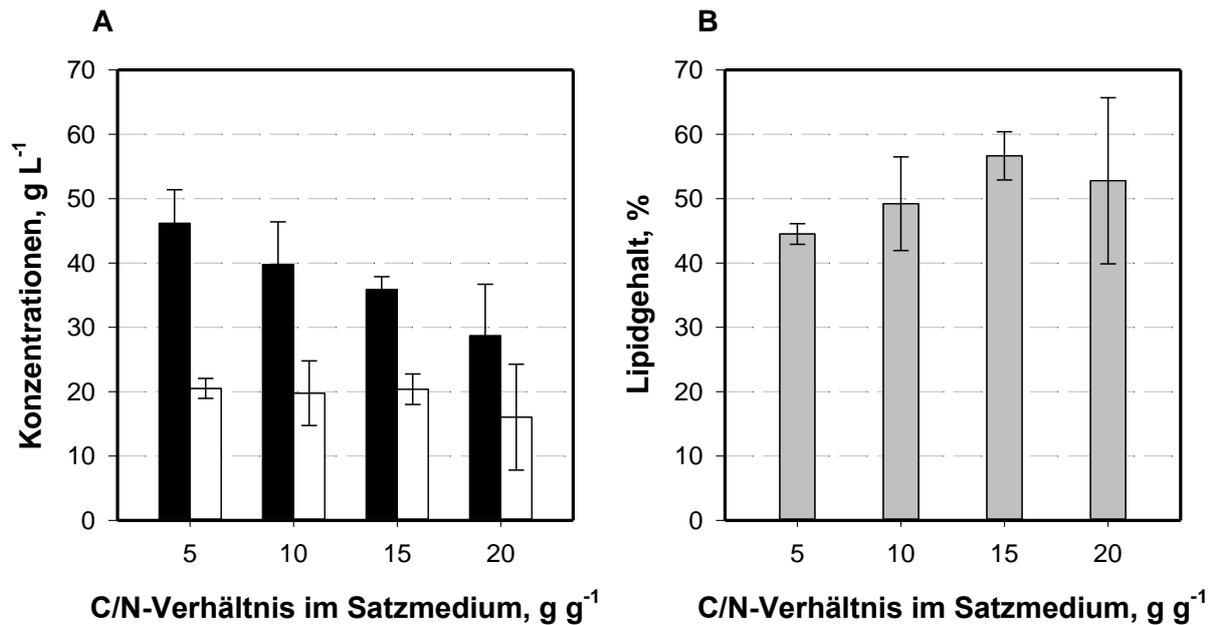


Abbildung 6.1: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h. Das C/N-Verhältnis im Satzmedium wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Ammoniumsulfat variiert.

Im Hinblick auf den Einsatz von komplexen Fermentationsmedien wie Algenhydrolysat, in denen noch viele Stickstoffquellen vorhanden sind, wurde bei einem identischen C/N-Verhältnis im vorgelegten Medium von 15 g g^{-1} das C/N-Verhältnis im Zulaufmedium variiert. Maximal bedeutet, dass das Zulaufmedium eine reine Glucoselösung war, während sonst entsprechende Mengen Ammoniumsulfat zum Einstellen des C/N-Verhältnisses zugegeben wurden.

Abbildung 6.2 zeigt keine eindeutige Abhängigkeit der finalen Biomassekonzentration vom C/N-Verhältnis im Zulaufmedium, während jedoch eine Tendenz für die Lipidkonzentration und den Lipidgehalt zu erkennen ist. Je höher das C/N-Verhältnis im Zulaufmedium, das heißt je weniger Stickstoff im Zulaufmedium vorhanden war, desto höhere Lipidgehalte können erzielt werden. Während für C/N-Verhältnisse im Zulaufmedium von $75 - 100 \text{ g g}^{-1}$ sowie bei der reinen Glucoselösung Lipidgehalte von $47 - 57 \%$ erreicht wurden, lagen diese bei $17 - 22 \%$ bei niedrigeren C/N-Verhältnissen im Zulaufmedium. Damit kann bei diesen Bedingungen *per definitionem* (Kapitel 3.3.1) nicht von einer vermehrten Lipidbildung gesprochen werden. Es trat während der Kultivierung keine Stickstofflimitierung unter diesen Bedingungen auf, während Glucose immer im Überschuss vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss des C/N-Verhältnisses im Zulaufmedium auf den Lipidgehalt spiegelt sich hiermit vor allem für die C/N-Verhältnisse von 25 g g^{-1} und 50 g g^{-1} in den Lipidkonzentrationen wider.

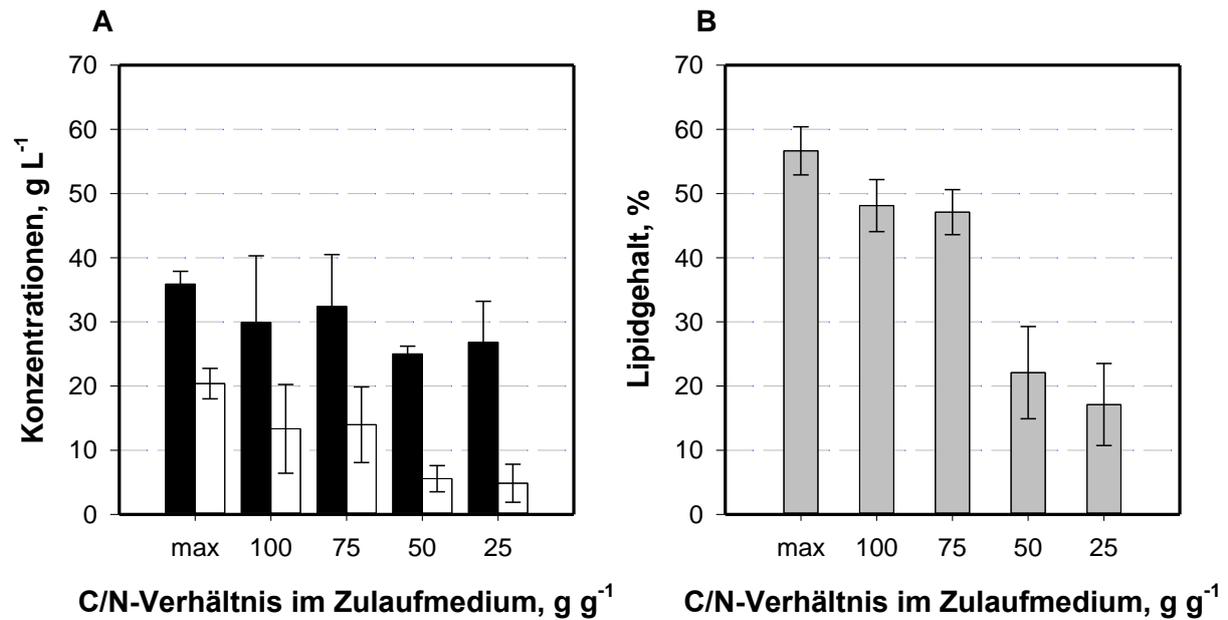


Abbildung 6.2: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 und einem C/N-Verhältnis im Satzmedium von 15 g g^{-1} vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 72 h. Das C/N-Verhältnis wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Ammoniumsulfat im Zulaufmedium variiert. (max = Zulauf mit reiner Glucoselösung)

Diskussion

Bereits in den 1970er- und 1980er-Jahren gab es Studien, um den Mechanismus der Lipidakkumulation oleogener Hefen unter stickstofflimitierenden Bedingungen aufzuklären (Botham und Ratledge, 1979; Evans und Ratledge, 1983b; Rattray et al., 1975). Die Anwendung eines Stickstoffmangels zur Induktion der Lipidbildung in oleogenen Hefen ist bis heute am häufigsten in Publikationen beschrieben (zum Beispiel Evans und Ratledge, 1984; Hassan et al., 1996; Park et al., 1990; Shen et al., 2013; Sitepu et al., 2013; Zheng et al., 2012). Da Stickstoff Bestandteil aller Aminosäuren und somit essentiell für den Protein- sowie Enzymhaushalt der Zelle ist, liegt der Stickstoffanteil in Hefen mit 6 - 9 % weit höher als beispielsweise der des Schwefels mit 0,01 - 0,25 % (Chmiel, 2011). Eine Stickstofflimitierung wirkt sich dadurch auch schneller beziehungsweise bei höheren C/N-Verhältnissen auf *T. oleaginosus* aus. Je weniger Stickstoff im Medium vorgelegt ist, desto schneller erfolgt eine Limitierung und desto mehr Lipide werden eingelagert. Es wird also in derselben Zeit ein höherer Lipidgehalt erreicht, je höher das C/N-Verhältnis ist. Ykema et al. (1989) nennen ein kritisches C/N-Verhältnis von 11 g g^{-1} , ab dem die Lipidbildung in *Apiotrichum curvatum* (heute: *T. oleaginosus*) beginnt. Eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses im Satzmedium von 5 g g^{-1} auf 99 g g^{-1} führte zu einer Zunahme des Lipidgehalts von 20 % auf 43 % in Studien von Park et al. (1990). Jedoch konnte bei Park et al. (1990) kein Effekt des C/N-Verhältnisses im Satzmedium auf die gebildete Biomasse beobachtet werden.

Für weitere Zulaufprozesse wurde ein C/N-Verhältnis im Satzmedium von 15 g g^{-1} gewählt. Das Zulaufmedium war eine reine Glucoselösung.

6.2 Einfluss des C/S-Verhältnisses

Wenn komplexe Fermentationsmedien wie Biomassehydrolysate zur Lipidproduktion mit oleogenen Hefen eingesetzt werden sollen, sind Alternativen zu einer Stickstofflimitierung zur Induktion der Lipidakkumulation zu untersuchen. Deshalb sind hier Ergebnisse zum Einfluss des C/S-Verhältnisses und damit einer Schwefellimitierung zur Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* gezeigt. Die gewählten C/S-Verhältnisse im Satzmedium stehen dabei für Kaliumsulfatkonzentrationen von $0,001 \text{ g L}^{-1}$ bis $0,05 \text{ g L}^{-1}$ bei 20 g L^{-1} Satzglucose. Im Zulaufmedium lagen 400 g L^{-1} Glucose und 25 g L^{-1} Ammoniumchlorid vor bei Kaliumsulfatkonzentrationen von 0 g L^{-1} bis $1,0 \text{ g L}^{-1}$, welche C/S-Verhältnisse im Zulaufmedium von maximal (=reine Glucoselösung) bis 869 g g^{-1} widerspiegeln. Der Einfluss des C/S-Verhältnisses auf Wachstum und Lipidproduktion ist in Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4 dargestellt.

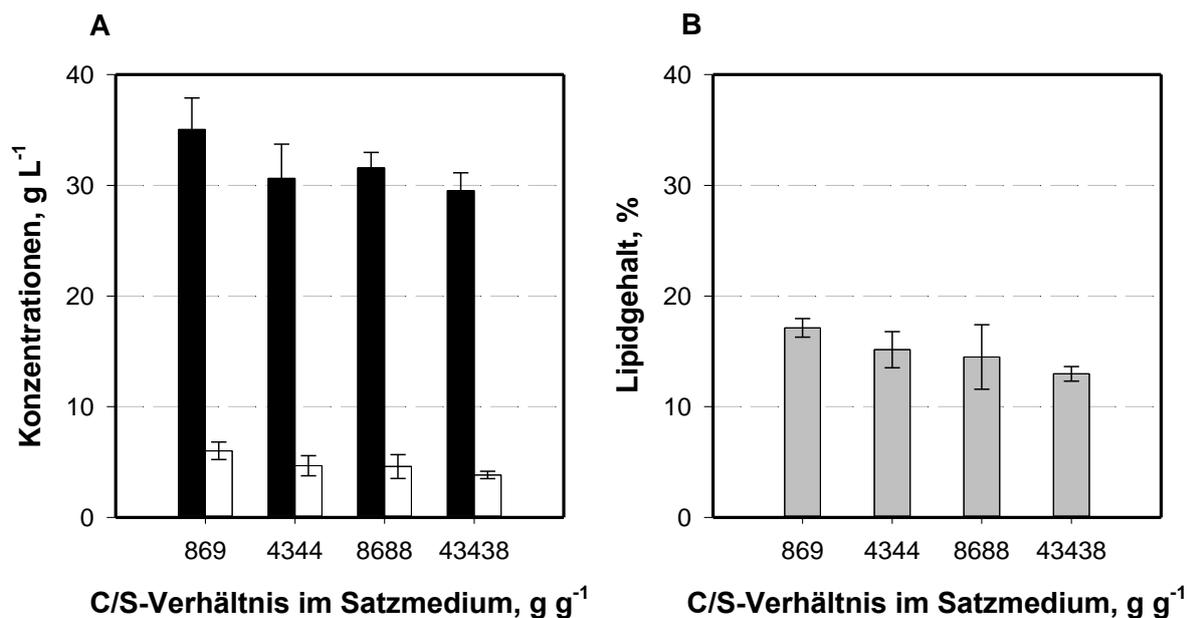


Abbildung 6.3: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 102 h. Das C/S-Verhältnis im Satzmedium wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Kaliumsulfat variiert.

Abbildung 6.3 zeigt keine signifikante Abhängigkeit der Biomassebildung und Lipidproduktion vom C/S-Verhältnis im Satzmedium. Je höher das C/S-Verhältnis im Satzmedium, desto weniger Biomasse aber auch weniger Lipide wurden tendenziell gebildet. Generell wurden bei allen Bedingungen nur Lipidgehalte unter 20 % gemessen, was nicht für eine erhöhte Lipidbildung spricht. So ist es möglich, dass die gewählten C/S-Verhältnisse beziehungsweise

Sulfatkonzentrationen ausreichend hoch für *T. oleaginosus* waren, um nicht limitierend für das Wachstum und nicht induzierend für die Lipidakkumulation gewesen zu sein.

Ein ähnliches Bild ist in Abbildung 6.4 zu sehen, in der die finalen Biomassekonzentrationen, Lipidkonzentrationen und Lipidgehalte bei verschiedenen C/S-Verhältnissen im Zulaufmedium dargestellt sind. In diesen Versuchsansätzen wurde ein C/S-Verhältnis im Satzmedium von 4344 g g⁻¹ gewählt, was einer geringen Satzkaliumsulfatkonzentration von 0,01 g L⁻¹ entsprach. Auch hier wurde tendenziell weniger Biomasse gebildet, je höher das C/S-Verhältnis im Zulaufmedium war. Allgemein sind die Unterschiede in den finalen Biomassekonzentrationen nicht sehr groß, zudem sind die Werte der Dreifachbestimmung deutlich fehlerbehaftet und daher sind die Unterschiede nicht als signifikant anzusehen. Die Lipidgehalte liegen für die drei untersuchten Bedingungen unter 20 %, weshalb auch hier kein Einfluss des C/S-Verhältnisses auf die Lipidakkumulation durch *T. oleaginosus* zu sehen ist. Möglicherweise wurde mit einem C/S-Verhältnis im Satzmedium von 4344 g g⁻¹ bereits zu viel der Schwefelquelle vorgelegt, um eine Limitierung zu erreichen.

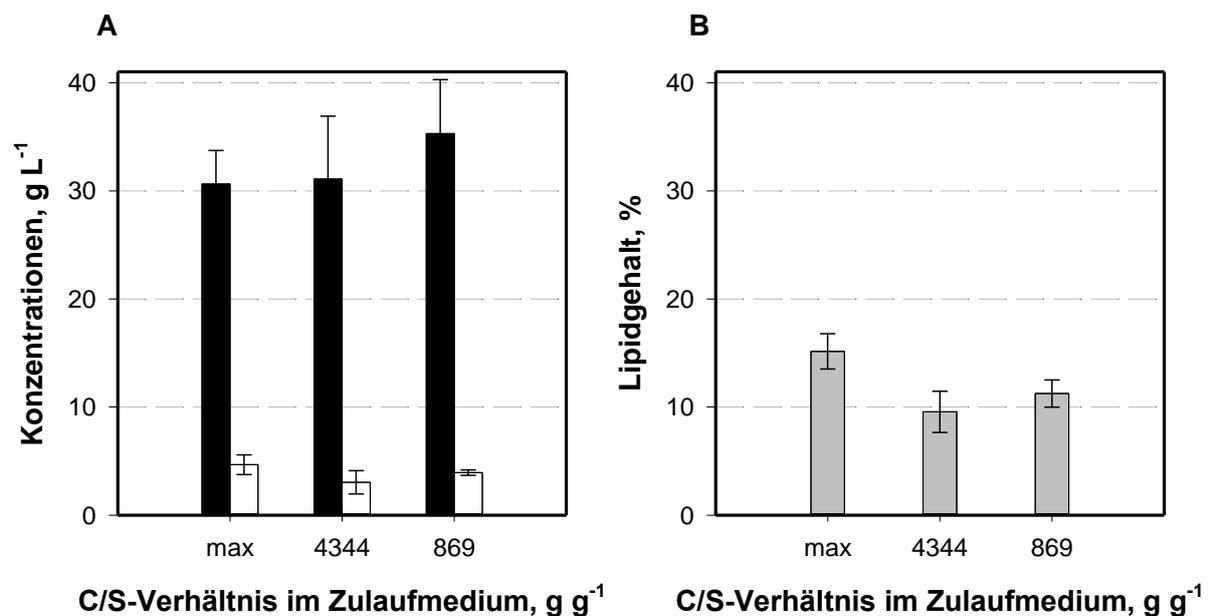


Abbildung 6.4: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L⁻¹ Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 und einem C/S-Verhältnis im Satzmedium von 4344 g g⁻¹ vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf mit einer Rate von 4 g L⁻¹ h⁻¹ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, 30 °C Reaktortemperatur, 20 °C Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ über 102 h. Das C/S-Verhältnis wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Kaliumsulfat im Zulaufmedium variiert. (max = Zulauf mit reiner Glucoselösung)

Diskussion

Bei allen C/S-Verhältnissen (869 - 43.438 g g⁻¹ oder 387 - 19.345 mol mol⁻¹) wurde in etwa der gleiche Lipidgehalt von <20 % erzielt. Somit liegen diese unter dem Wert, ab dem man von vermehrter Ölbildung spricht (Wynn und Ratledge, 2005). Bei der Hefe *Rhodospidium toruloides* wurde ein Einfluss des C/S-Verhältnisses auf die Lipidproduktion berichtet. Es

wurde bei einem C/S-Verhältnis von $46.750 \text{ mol mol}^{-1}$ ein Lipidgehalt von 58 % gemessen. Zudem wurde auch bei einem niedrigeren C/S-Verhältnis von $18.310 \text{ mol mol}^{-1}$ bereits ein Lipidgehalt von 56 % erreicht (Wu et al., 2011). In dieser Studie wird jedoch auch berichtet, dass eine Schwefellimitierung nicht so effektiv ist wie eine Stickstoff- oder Phosphorlimitierung. Dies könnte auch für *T. oleaginosus* zutreffen und die Ergebnisse erklären. Außerdem ist der Mechanismus, der zu einer vermehrten Lipidakkumulation bei Schwefellimitierung führt, noch nicht untersucht. Schwefel wird in der Zelle vor allem für schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein und Methionin benötigt sowie für Vitamine wie Biotin oder Coenzym A (Weuster-Botz, 1999). Generell ist Schwefel ein essentielles Element für Mikroorganismen, jedoch macht es in Hefen nur 0,01 - 0,25 % (w/w) der Trockensubstanz aus (Chmiel, 2011). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich eine Schwefellimitierung erst bei sehr geringen Satzkonzentrationen auf die Hefe auswirkt.

Für weitere Zulaufprozesse wurde eine Schwefellimitierung nicht mehr untersucht und Sulfat daher immer deutlich im Überschuss zugegeben (siehe definiertes Medium in Tabelle 4.2).

6.3 Einfluss des C/P-Verhältnisses

Die gewählten C/P-Verhältnisse im Satzmedium stehen dabei für Kaliumdihydrogenphosphatkonzentrationen von $0,001 \text{ g L}^{-1}$ bis $0,05 \text{ g L}^{-1}$ bei 20 g L^{-1} Satzglucose. Im Zulaufmedium lagen 400 g L^{-1} Glucose und 25 g L^{-1} Ammoniumsulfat vor bei Kaliumdihydrogenphosphatkonzentrationen von 0 g L^{-1} bis $1,0 \text{ g L}^{-1}$, welche C/P-Verhältnisse im Zulaufmedium von maximal (=reine Glucoselösung) bis 702 g g^{-1} widerspiegeln. Ergebnisse zum Einfluss des C/P-Verhältnisses auf Wachstum und Lipidproduktion sind in Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6 dargestellt.

Die Variation des C/P-Verhältnisses im Satzmedium zwischen $702 - 35177 \text{ g g}^{-1}$ nahm keinen signifikanten Einfluss auf die finale Biomassekonzentration. Nach 102 h lagen die Biomassekonzentrationen zwischen $24,9 \pm 2,8 \text{ g L}^{-1}$ und $34,5 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$, wobei die höchste Biomasse bei einem mittleren C/P-Verhältnis von 7024 g g^{-1} gemessen wurde. Die Lipidkonzentrationen lagen auch mit $8,1 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$ bis $13,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ alle in einem ähnlichen Bereich. Mit zunehmendem C/P-Verhältnis im Satzmedium, das heißt je weniger Phosphat im Medium vorgelegt wurde, erhöhte sich der Lipidgehalt von $38,8 \pm 2,1 \%$ auf $39,4 \pm 1,0 \%$, wobei diese Steigerung nicht signifikant ist. Beim höchsten C/P-Verhältnis im Satzmedium von 35117 g g^{-1} wurde der niedrigste Lipidgehalt mit 32 % gemessen.

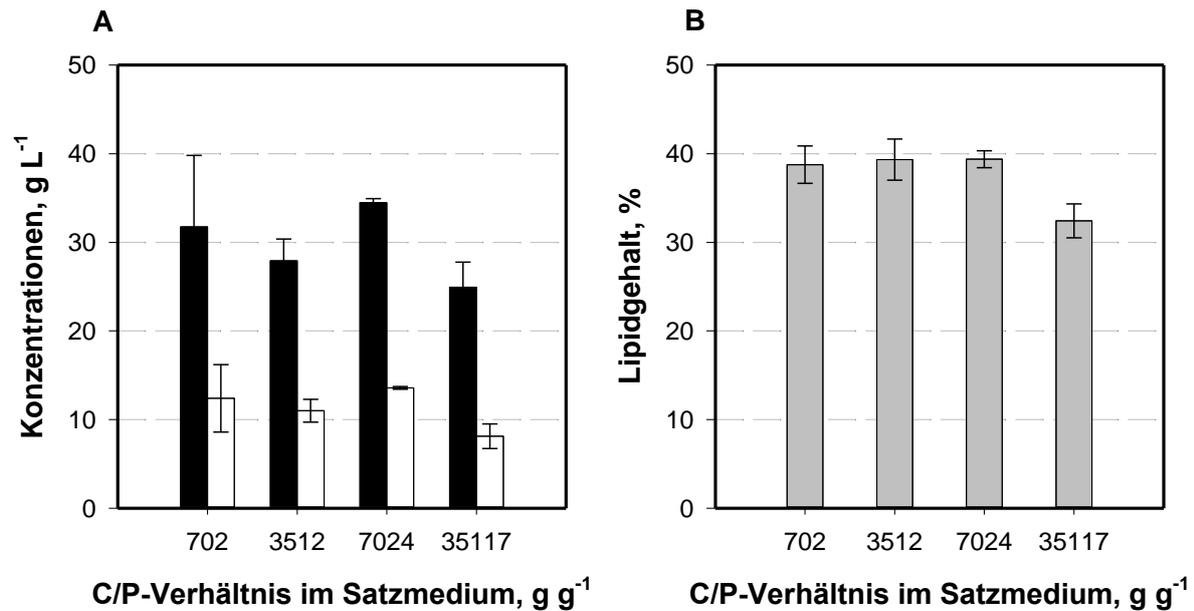


Abbildung 6.5: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 102 h. Das C/P-Verhältnis im Satzmedium wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Kaliumhydrogenphosphat variiert.

Für die Untersuchung des Einflusses des C/P-Verhältnisses im Zulaufmedium wurde ein C/P-Verhältnis im Satzmedium von 3512 g g^{-1} gewählt, was einer geringen Satzkaliumdihydrogenphosphatkonzentration von $0,01 \text{ g L}^{-1}$ entsprach. Die Ergebnisse aus parallelen Zulaufversuchen mit verschiedenen C/P-Verhältnissen im Zulaufmedium, die in Abbildung 6.6 dargestellt sind, lassen teils einen deutlichen Einfluss erkennen: Je niedriger das C/P-Verhältnis im Zulaufmedium, desto mehr Biomasse wird gebildet. Die Lipidkonzentration bleibt jedoch relativ konstant bei $10,1 - 12,1 \text{ g L}^{-1}$. Der Lipidgehalt spiegelt genau einen entgegen gesetzten Trend wider: mit zunehmenden C/P-Verhältnis im Zulaufmedium beziehungsweise Zulauf einer reinen Glucoselösung steigt der intrazelluläre Lipidgehalt von $26 \pm 2 \%$ auf $39 \pm 2 \%$. Dies war beides so zu erwarten, da mehr zugeführtes Phosphat zu mehr Wachstum führen sollte aber zu einer späteren Nährstofflimitierung und somit geringerer Lipidbildung. Für den Lipidgehalt konnte dies auch tendenziell bereits in Versuchen zum Einfluss des C/N-Verhältnisses im Zulaufmedium beobachtet werden.

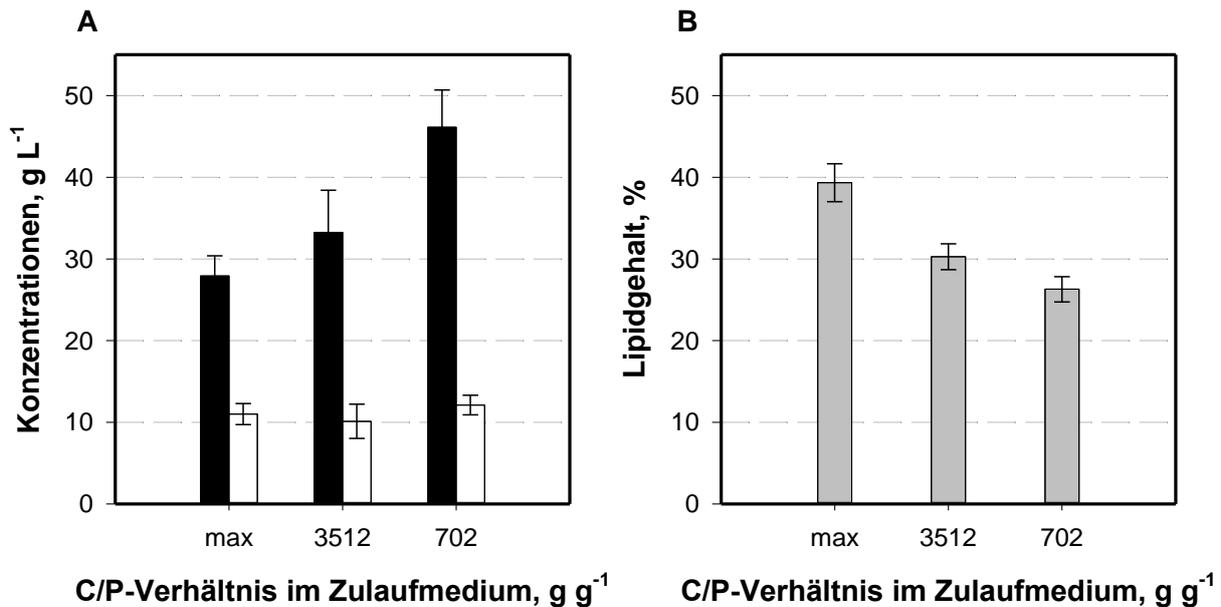


Abbildung 6.6: Finale Biomassekonzentrationen (schwarz) (A), Lipidkonzentrationen (weiß) (A) und Lipidgehalte (B) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit pH 6,5 und einem C/P-Verhältnis im Satzmedium von 3512 g g^{-1} vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 102 h. Das C/P-Verhältnis im Zulaufmedium wurde durch Vorlage verschiedener Konzentrationen Kaliumhydrogenphosphat variiert. (max = Zulauf mit reiner Glucoselösung)

Generell zeigen diese Versuche, dass die Lipidproduktion in *T. oleaginosus* auch bei einer Phosphorlimitierung und gleichzeitigem Kohlenhydratüberschuss erfolgreich induziert werden kann. Die absolut eingesetzten Mengen an Phosphor in Form von Kaliumhydrogenphosphat sind dabei jedoch deutlich geringer als an Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat (Faktor 220). Außerdem lagert *T. oleaginosus* nur etwa zwei Drittel der Lipide unter Phosphorlimitierung trotz 30 h längerer Prozesszeit ein.

Diskussion

Auch beim Einsatz einer Phosphorlimitierung konnte ein Einfluss des C/P-Verhältnisses auf die Lipidakkumulation beobachtet werden. Je höher das C/P-Verhältnis im Zulaufmedium war, desto höhere Lipidgehalte wurden erreicht. Mit *T. oleaginosus* konnten allerdings nur geringere Lipidgehalte bei Phosphorlimitierung als bei Stickstofflimitierung erzielt werden (39 % im Vergleich zu 57 %), obwohl die Prozesszeit von 72 h auf 102 h verlängert wurde. Damit wird deutlich, dass eine Phosphorlimitierung weniger effektiv ist als eine Stickstofflimitierung. Eine Stickstofflimitierung führt intrazellulär zuerst zu einer Spaltung von AMP zu IMP und freiem Ammonium, das dadurch für die Zelle wieder verfügbar wird. AMP fehlt somit als allosterischer Induktor für weitere enzymatische Reaktionen und als Konsequenz lagert die Zelle, wie in Kapitel 3.3.2 erläutert, vermehrt Speicherlipide ein. Bei einer Phosphatlimitierung kann es möglicherweise ebenfalls zu einem Abbau von AMP durch die oleogene Hefe kommen, um Phosphat kurzfristig intrazellulär wieder verfügbar zu machen. Dies hätte schließlich dieselben biochemischen Vorgänge zu Folge wie bei einer Stickstofflimitierung: die Hefe produziert

vermehrt Speicherlipide. Ein Mechanismus zur Lipidakkumulation unter Phosphorlimitierung ist jedoch auf molekularer Ebene noch nicht beschrieben. Wu et al. (2010a) berichten über die erfolgreiche Lipidproduktion unter phosphatlimitierenden Bedingungen für die Hefe *Rhodospordium toruloides* mit einem Lipidgehalt von bis zu 62 % bei einem C/P-Verhältnis von 9552 mol mol⁻¹. Mit zunehmendem C/P-Verhältnis im Satzmedium erzielten sie in ihrer Studie auch einen zunehmenden Lipidgehalt. In dieser Arbeit wurde mit einem C/P-Verhältnis (Satz und Zulauf) von 3512 g g⁻¹ (entspricht 1511 mol mol⁻¹) 39 % (w/w) Lipide eingelagert, während bei einem vergleichbaren C/P-Verhältnis von 2045 mol mol⁻¹ bei Wu et al. (2010a) mit *Rhodospordium toruloides* 43 % (w/w) Lipide eingelagert wurden.

Da Stickstoff hauptsächlich in Proteinen vorkommt, ist in Biomassehydrolysaten mit hohem Restproteingehalt wie Mikroalgenhydrolysat generell mit viel verfügbarem Stickstoff zu rechnen. Ist zudem, wie in Algenhydrolysat, nur eine geringe Menge an Kohlenhydraten enthalten (siehe Kapitel 5.1.1), spiegelt sich das in einem niedrigen C/N-Verhältnis wider (siehe Tabelle 6.1). Somit ist eine erfolgreiche Lipidproduktion mit hohen Lipidgehalten in komplexen Fermentationsmedien wie Algenhydrolysat ohne Vorbehandlung wahrscheinlich nicht möglich (siehe Kapitel 5.1).

Tabelle 6.1: Übersicht über C/N- und C/P-Verhältnis verschiedener Medien sowie die damit erzielten Lipidgehalte in Prozessen im Millilitermaßstab mit *T. oleaginosus*.

	C/N-Verhältnis	C/P-Verhältnis	Lipidgehalt
Definiertes Medium mit N-Limitierung (Kapitel 6.1)	15,4 g g ⁻¹	11,4 g g ⁻¹	57 ± 4 %
Definiertes Medium mit P-Limitierung (Kapitel 6.3)	3,77 g g ⁻¹	3512 g g ⁻¹	39 ± 2 %
Algenhydrolysat (Kapitel 5.1.1)	5,19 g g ⁻¹	11,6 g g ⁻¹	12 ± 2 %

6.4 Einfluss des pH

Um den Einfluss des pH auf die Lipidakkumulation von *T. oleaginosus* zu untersuchen, wurde die Hefe in vier verschiedenen Medien mit einem C/N-Verhältnis im Satzmedium von 15 g g⁻¹ und einem pH-Bereich von 5,0 bis 6,5 in Zulaufkultivierungen im Millilitermaßstab über 99 h kultiviert. Um einen konstanten pH während des gesamten Prozesses sowie einen pH unter 6,5 zu realisieren, musste das definierte Medium (Tabelle 4.2) mit 1 M MES-Puffer (2-N-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer) versetzt werden. Aufgrund der vorhandenen Ausstattung des Bioreaktorblocks (pH-Sensorriegel arbeiten nur in einem pH-Bereich von 6,5 - 8,0) erfolgte die pH-Messung alle 24 h manuell und gegebenenfalls erfolgte eine Korrektur des pH mit 1 M KOH. So konnte der pH beim Sollwert ± 0,2 konstant gehalten werden.

Beim Vergleich der in Abbildung 6.7 dargestellten Ergebnisse zum Einfluss des pH, ist deutlich zu erkennen, dass mit dem niedrigsten, untersuchten pH von 5,0 das schlechteste Ergebnis erzielt wurde: Die finale Biomassekonzentration ist fast um den Faktor 2 geringer als bei den höheren pH (Abbildung 6.7 A). Der Lipidgehalt ist sogar um den Faktor 4 geringer (Abbildung 6.7 B), die Lipidkonzentration (Abbildung 6.7 C) und Raum-Zeit-Ausbeute (Abbildung 6.7 D) um den Faktor 5 im Vergleich zu pH 5,5. Während für die Biomasseproduktion kein signifikanter Einfluss des pH zwischen pH 6,0 und pH 6,5 zu sehen ist (Abbildung 6.7 A), zeigte sich die beste Lipidproduktion bei pH 5,5. Hier wurde nach 99 h ein Lipidgehalt von $81 \pm 3 \%$ bei $25,9 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ Lipiden sowie einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,26 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Wird der pH weiter erhöht, sinken Lipidgehalt, Lipidkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeute, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen pH 6,0 und pH 6,5 zu erkennen sind.

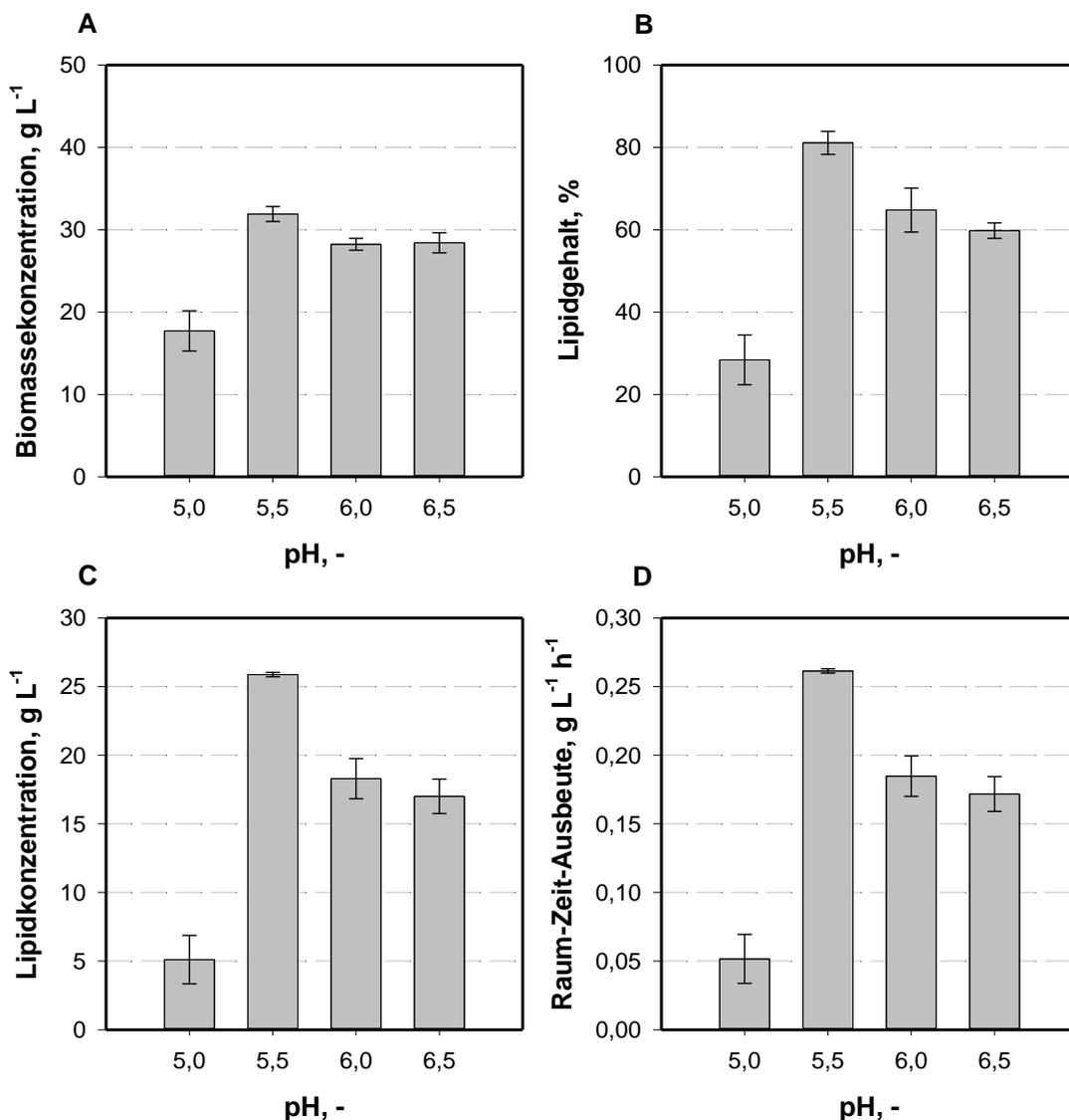


Abbildung 6.7: Finale Biomassekonzentrationen (A), Lipidgehalte (B), Lipidkonzentrationen (C) und Raum-Zeit-Ausbeuten (D) aus parallelen Zulaufversuchen ($n = 3$) mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab. Es wurden je 20 g L^{-1} Zucker in einem definierten Medium mit 1 M MES-Puffer und einem C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} vorgelegt. Nach einer Satzphase von 6 h erfolgte der Zulauf einer konzentrierten Zuckerlösung mit einer Rate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis 24 h und wurde danach halbiert. Die Kultivierung erfolgte bei 2800 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ Reaktortemperatur, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ Kopfraumtemperatur und einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ über 99 h.

Diskussion

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der pH des Kultivierungsmediums ebenfalls einen Einfluss auf die Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* hat. Bei den vier untersuchten pH eignete sich ein pH von 5,5 am besten für die Lipidbildung. Bei niedrigerem und höherem pH wurden weniger Lipide gebildet und teilweise auch weniger Biomasse. Moon et al. (1978) beschreiben ein Optimum von pH 5,8 für die Lipidbildung mit *Candida curvata* D (heute *T. oleaginosus*), wobei ein Komplexmedium (Molkenpermeat) mit einem Bereich zwischen pH 5,0 und pH 6,2 untersucht wurde. Auch mit Zuckerrübenmelasse als Medium konnte eine ähnliche Tendenz und ein Optimum von pH 5,4 für *T. oleaginosus* gefunden werden (Leman et al., 1990). Die deutlich niedrigeren Biomassen- und Lipidkonzentrationen sowie der Lipidgehalt und die Lipidausbeute bei pH 5,0 im Vergleich zu den anderen pH wurde in der Literatur bei den eingesetzten Komplexmedien jedoch nicht festgestellt (Leman et al., 1990; Moon et al., 1978).

6.5 Zulaufprozesse im Milliliter- und Liter-Maßstab

Skalierbarkeit

Mithilfe obiger Daten wurde ein Zulaufverfahren zur Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* unter Stickstofflimitierung entwickelt. Dabei betrug das initiale C/N-Verhältnis 15 g g^{-1} mit 20 g L^{-1} Glucose, alle weiteren Nährstoffe lagen im Überschuss vor. Um den Einsatz eines Puffers (1 M MES) im Millilitermaßstab zu vermeiden, wurde bei einem pH von 6,5 kultiviert. Die Kultivierung erfolgte zudem bei 30 °C und einem Zulaufmassenstrom von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 6 h und 24 h sowie $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 24 h und 72 h. Im Millilitermaßstab erfolgte der Gaseintrag über gasinduzierende Rührer bei 2800 rpm und einer Kopfraumbegasung von $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$ bei 10 mL Arbeitsvolumen. Im Litermaßstab wurden 3 L Arbeitsvolumen mit 2 L min^{-1} Prozessluft (Volumenbegasung) begast und bei 800 rpm gerührt. Skalierungskriterium zwischen den beiden Maßstäben war hierbei die Gelöstsauerstoffkonzentration, die in beiden Systemen immer über 20 % gehalten wurde.

Die Vergleichbarkeit zwischen Milliliter- und Litermaßstab ist Abbildung 6.8 gezeigt. Der Verlauf der OD_{600} ist in beiden Systemen nahezu identisch, wobei im Litermaßstab nach 72 h Prozesszeit etwas höhere Werte von 72,5 im Vergleich zu 59,9 erzielt wurden (Abbildung 6.8 links). Der Verlauf der OD_{600} für den Millilitermaßstab zeigt gerade zu Prozessende ab 48 h starke Schwankungen. Daher kann ab diesem Zeitpunkt keine klare Aussage mehr bezüglich der Vergleichbarkeit der beiden Prozessmaßstäbe getroffen werden. Die Gelöstsauerstoffkonzentration nimmt in beiden Maßstäben von Prozessbeginn an ab und fällt nie unter 20 % (Abbildung 6.8 rechts). Während jedoch im Millilitermaßstab die Gelöstsauerstoffkonzentration ab circa 8 h wieder zunimmt und ab 40 h um den Ausgangswert von 100 % schwankt, nimmt die Gelöstsauerstoffkonzentration im Litermaßstab erst ab circa

20 h wieder zu. Ab circa 49 h ist ein stärkeres Rauschen der Gelöstsauerstoffkonzentration im Litermaßstab zu beobachten, was auf ein Nachlassen der Messqualität der pO_2 -Sonde zu Prozessende zurückzuführen ist.

Tabelle 6.2 zeigt einen Vergleich der ermittelten Prozessgrößen in beiden Maßstäben. Hier treten deutlichere Unterschiede auf: Sowohl der Lipidgehalt unterscheidet sich in beiden Maßstäben um 11 %, als auch die Biomassekonzentration um fast 10 g L^{-1} : Beides ist höher im Litermaßstab. Dadurch sind auch die Größen der Lipidproduktion wie Lipidkonzentration, Raum-Zeit-Ausbeute und Lipidausbeute im Litermaßstab höher als im Millilitermaßstab.

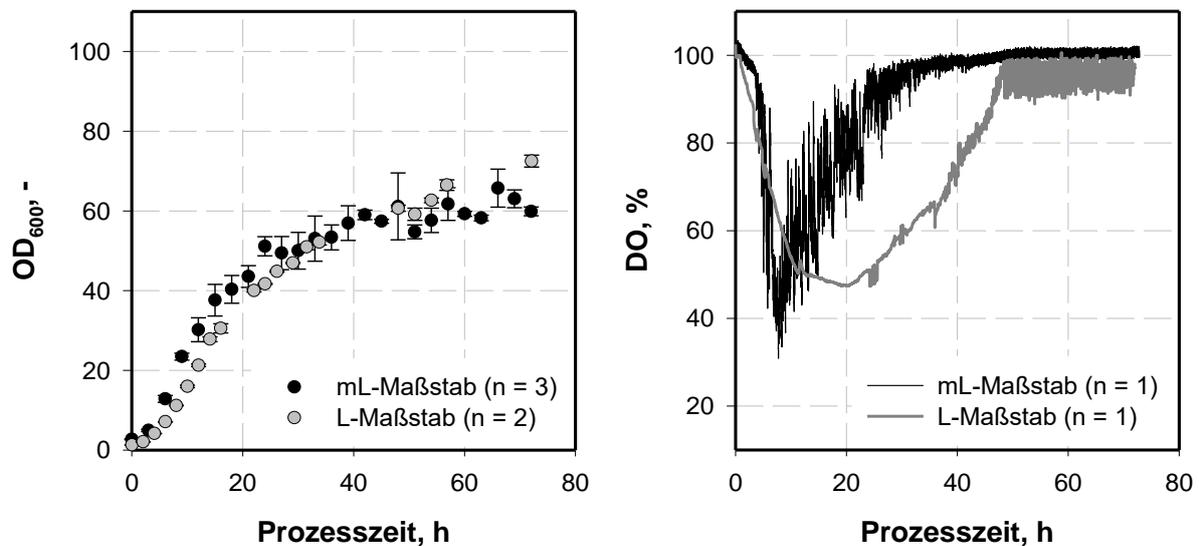


Abbildung 6.8: Verlauf der optischen Dichte OD_{600} (links) und der Gelöstsauerstoffkonzentration (rechts) für Zulaufprozesse mit *T. oleaginosus* im Millilitermaßstab (schwarz) und Litermaßstab (grau). Es wurden 20 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 6,5 über 72 h. Die Zulaufraten betragen $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 6 - 24 h und $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 24 - 72 h. Im Millilitermaßstab wurde bei 2800 rpm gerührt und mit $0,1 \text{ L min}^{-1}$ Reaktor $^{-1}$ (Kopfraumbegasung) begast, während im Litermaßstab bei 800 rpm gerührt und mit 2 L min^{-1} (Volumenbegasung) begast wurde.

Tabelle 6.2: Parameter zu Wachstum und Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* in Zulaufkultivierungen nach 72 h in zwei Maßstäben. ^a Mittelwert und Standardabweichung aus $n = 3$; ^b Mittelwert und Standardabweichung aus $n = 2$

	Millilitermaßstab ^a	Litermaßstab ^b
Biomassekonzentration $c_X, \text{ g L}^{-1}$	$35,9 \pm 1,9$	$45,5 \pm 0,7$
Lipidgehalt $Y_{LX}, \text{ g g}^{-1}$	57 ± 4	68 ± 0
Lipidkonzentration $c_L, \text{ g L}^{-1}$	$20,4 \pm 2,4$	$31,4 \pm 0,0$
Raum-Zeit-Ausbeute RZA, $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,28 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,00$
Lipidausbeute $Y_{LS}, \text{ g g}^{-1}$	$0,12 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$

Reproduzierbarkeit

Zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit der Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* im Litermaßstab sind in Abbildung 6.9 Ergebnisse aus zwei Zulaufkultivierungen vergleichend dargestellt. Sowohl die lipidfreie Biomassekonzentration als auch die (lipidhaltige) Biomassekonzentration (A, B) nehmen im Verlauf der Prozesszeit für beide Versuche nahezu identisch zu. Sobald der verfügbare Stickstoff im Medium (und Stickstoffreserven in den Zellen) aufgebraucht ist, stagniert die lipidfreie Biomassekonzentration (A) oder nimmt sogar leicht ab, während die lipidhaltige Biomassekonzentration (B) weiter zunimmt. Dies ist auf die Einlagerung von Speicherlipiden zurückzuführen, was anhand der Zunahme der Lipidkonzentration (C) und des Lipidgehalts (D) zu erkennen ist. Nach circa 12 h ist die Stickstoffquelle im Medium verbraucht (E), sodass die Zellen mit der Akkumulation der Lipide beginnen. Sowohl der Lipidgehalt als auch die Lipidkonzentration beginnen ab diesem Zeitpunkt zu steigen. Die Raum-Zeit-Ausbeute (F) nimmt ab diesem Zeitpunkt ebenfalls kontinuierlich zu, da fortlaufend Lipide eingelagert werden. Zum Ende des Prozesses reduziert sich die Einlagerung von Lipiden, was an dem Abflachen des Lipidgehalts zu erkennen ist, weshalb auch die Raum-Zeit-Ausbeute zum Ende leicht abnimmt. In 72 h Prozesszeit werden $31,4 \text{ g L}^{-1}$ Lipide (68 % Lipidgehalt) mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ produziert. Die Daten zum Wachstum und zur Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* lassen sich im Litermaßstab sehr gut reproduzieren.

Die Kohlenstoffbilanz kann für beide Versuche gut geschlossen werden. So kann einerseits 104 % des Kohlenstoffs und andererseits 114 % des Kohlenstoffs nach 72 h wiedergefunden werden. Da als intrazelluläres Produkt nur der Lipidgehalt gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass in den Zulaufprozessen im Litermaßstab der zugeführte Kohlenstoff nur in Form von Lipiden eingelagert wird und nicht zum Beispiel in Speicherkohlenhydraten, da die Bilanz geschlossen ist.

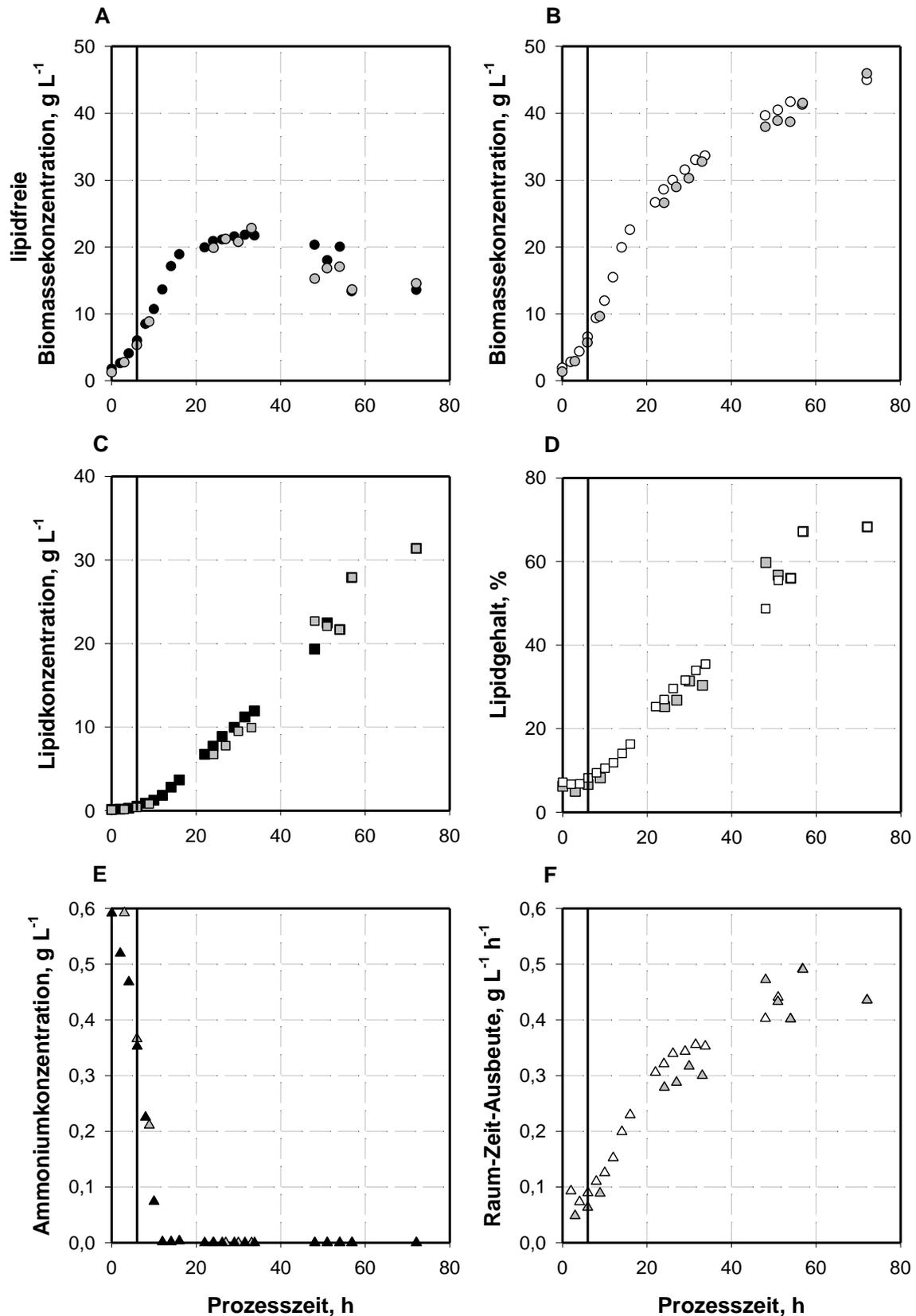


Abbildung 6.9: (Lipidfreie) Biomassekonzentration (A, B), Lipidkonzentration (C), Lipidgehalt (D), Ammoniumkonzentration (E) und Raum-Zeit-Ausbeute (F) aus zwei Zulaufkultivierungen mit *T. oleaginosus* im Litermaßstab (Graue Symbole zeigen den Versuch zur Reproduktion der Daten). Es wurden 20 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 800 rpm , 2 L min^{-1} Begasung und pH 6,5 über 72 h. Die Zulafraten betragen $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 6 - 24 h und $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zwischen 24 - 72 h. Der Beginn des Zulaufs ist durch die schwarze, vertikale Linie gekennzeichnet.

Diskussion

Abschließend sind in diesem Kapitel ein Zulaufverfahren zur Lipidproduktion im Milliliter- und Litermaßstab gezeigt. Dabei ist die Skalierbarkeit zwischen beiden Maßstäben hinsichtlich Wachstum (Verlauf der OD_{600}) bis circa 48 h gegeben. Anschließend schwanken die Messwerte für die OD_{600} im Millilitermaßstab stark, so dass keine gute Aussagekraft mehr vorliegt. Auch weichen die Prozessgrößen zwischen den Maßstäben ab. Generell wird im Litermaßstab ein höherer Lipidgehalt detektiert, weshalb auch die Lipidkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeute deutlich höher ausfallen. Da im Millilitermaßstab der Sauerstoffeintrag höher als im Litermaßstab ist (Hortsch, 2011), könnte dies ein möglicher Grund für die geringere Lipidproduktion sein. In Kultivierungen mit *Rhodotorula glutinis* nahm der Lipidgehalt in den Zellen ab, wenn höhere Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Medium vorhanden waren (Yen und Zhang, 2011). In den Zulaufprozessen im Millilitermaßstab wurden in dieser Arbeit auch für längerer Zeit (>30 h) zum Teil höhere Gelöstsauerstoffkonzentrationen gemessen. Jedoch war die Gelöstsauerstoffkonzentration in beiden Maßstäben zu Prozessende fast identisch bei ~100 %.

Die Lipidproduktion von *T. oleaginosus* in den Zulaufprozessen im Litermaßstab ist gut reproduzierbar, was anhand der starken Überlappung der Kurvenverläufe in Abbildung 6.9 zu erkennen ist. Deshalb und aufgrund der teils langen Kultivierungsdauer werden in den folgenden Kapiteln meist nur Einzelversuche im Litermaßstab dargestellt.

7 Lipidproduktion mit *Trichosporon oleaginosus* im Membranbioreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung

Wie bereits in Kapitel 5 erläutert, liegen nach enzymatischer Hydrolyse von Mikroalgenbiomasse nur geringe Zuckerkonzentrationen von $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$ in Algenhydrolysat vor (siehe Abbildung 5.2 und Abbildung 5.8). Daher ist es nötig, ein Verfahren zur Lipidproduktion mit niedrig konzentrierten Kohlenstoffquellen zu erarbeiten. Hierfür wurde die Herstellung mikrobieller Öle in einem kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung untersucht. In Prozessen im Labormaßstab mit definierten Medien werden zuerst Ergebnisse mit Stickstofflimitierung gezeigt, da sich in Kapitel 6 eine Stickstofflimitierung besser für die Lipidherstellung eignete als eine Phosphorlimitierung. Unter stickstofflimitierenden Bedingungen wurden experimentelle Untersuchungen sowohl mit Glucose als auch mit einem Zuckergemisch (60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose, 20 % (w/w) Galactose) durchgeführt. Weiterhin wurde die Produktion mikrobieller Öle unter phosphorlimitierenden Bedingungen mit Glucose beziehungsweise mit Algenhydrolysat als Substrat betrachtet. Abschließend werden Resultate aus einer Maßstabsvergrößerung unter definierten Bedingungen dargestellt.

7.1 Reaktionstechnische Charakterisierung im Labormaßstab

Für die Untersuchungen von *T. oleaginosus* im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung im Labormaßstab wurde ein üblicher Laborrührkesselreaktor im Bypass mit einem Hohlfasermembranmodul zur Zellrückhaltung erweitert. Bei den kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung war das Zulaufmedium bis auf das C/N-Verhältnis identisch zum Satzmedium. Die Zuckerkonzentration in definierten Medien betrug 30 g L^{-1} .

7.1.1 Lipidproduktion unter N-Limitierung mit Glucose als Substrat

Wie in Kapitel 5.1 dargestellt, treten bei der Verwendung von Algenhydrolysat als Fermentationsmedium zwei Probleme auf. Zum einen ist der Kohlenhydratanteil in den Mikroalgen mit circa 10 % sehr gering, sodass folglich die Zuckerkonzentration im Algenhydrolysat mit $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$ ebenfalls gering ist. Dadurch ist eine halbkontinuierliche Prozessführung nicht möglich, da das Arbeitsvolumen im Reaktor zu sehr steigen würde und die Zellkonzentration dadurch verdünnt würde. Zum anderen konnte mit unbehandeltem Algenhydrolysat im Medium keine Nährstofflimitierung zur Induktion der Lipidakkumulation erreicht werden.

Um das Problem der niedrigen Zuckerkonzentration im Medium zu lösen, wurde ein Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung verwendet. So konnte das gering konzentrierte Zulaufmedium zugegeben werden und gleichzeitig verbrauchtes, zellfreies Medium

abgezogen werden, um das Arbeitsvolumen konstant zu halten. Dabei wurde zunächst ein Versuch zur Lipidproduktion unter Stickstofflimitierung in definiertem Medium durchgeführt, um die Eignung des Bioreaktors zu prüfen. Der Prozess gliederte sich in zwei Phasen: eine anfängliche Satzphase (I), in dem ein Medium mit 30 g L^{-1} Zucker und C/N 15 g g^{-1} vorgelegt wurde, und eine Produktionsphase (II), bei der das Zulaufmedium (30 g L^{-1} Zucker und C/N 100 g g^{-1}) mit einer Verdünnungsrate von $0,065 \text{ h}^{-1}$ durch den Membranbioreaktor gepumpt wurde. Die weiteren Reaktionsbedingungen waren $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 800 rpm , 2 L min^{-1} Begasung mit steriles Luft und pH 6,5 bei einem konstanten Arbeitsvolumen von $2,8 \text{ L}$.

Abbildung 7.1 zeigt die zeitlichen Verläufe der wichtigsten Prozessgrößen. Es ist gut zu erkennen, dass die lipidfreie Biomassekonzentration auch nach Beginn des Zulaufs in der Produktionsphase weiter linear zunahm (Abbildung 7.1 A). Zu diesem Zeitpunkt herrschte eine Stickstofflimitierung im Medium (Abbildung 7.1 E), obwohl mit dem Zulaufmedium kontinuierlich geringe Mengen Ammonium zugegeben wurden. Im Gegensatz dazu stagnierte die lipidfreie Biomassekonzentration im Zulaufverfahren im Litermaßstab (siehe Abbildung 6.9), sobald das vorgelegte Ammonium verbraucht war. Die lineare Zunahme der Biomassekonzentration während der Produktionsphase ergibt sich aus der konstanten Durchflussrate.

Zum Ende der Satzphase besitzen die Zellen einen Lipidgehalt von 12% , der im Laufe der Produktionsphase auf 53% ($1,96 \text{ d}$) steigt und dann stark um diesen Wert schwankt. Die Lipidkonzentration steigt analog dazu und erzielt nach $4,5 \text{ d}$ Produktionszeit das Maximum mit $30,5 \text{ g L}^{-1}$. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wird nach $1,96 \text{ d}$ Produktionszeit zum Zeitpunkt des maximalen intrazellulären Lipidgehalts erreicht. Da der Lipidgehalt anschließend schwankt und teils wieder abnimmt, sinkt auch die Raum-Zeit-Ausbeute wieder und liegt zum Ende des Prozesses bei $0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Schwankungen im Lipidgehalt können zum einen durch Messungenauigkeiten hervorgerufen sein. Zum anderen fällt auf, dass bereits nach $0,58 \text{ d}$ Prozesszeit die Zuckerkonzentration im Medium bei $\sim 0 \text{ g L}^{-1}$ liegt. Damit liegt kein Überschuss der Kohlenstoffquelle mehr vor, sondern die zudosierte Glucose wird sofort von den Zellen verbraucht. Da die Zellkonzentration weiter zunimmt, kann es dadurch zu einer Reduzierung der zellspezifischen Lipidbildungsrate kommen, weshalb weniger Lipide eingelagert werden. Andererseits ist es für die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses vorteilhaft, wenn das eingesetzte Substrat komplett verbraucht wird (hoher Substratumsatz).

Zur Vereinfachung der Darstellung sind in Abbildung 7.1 und bei allen weiteren Abbildungen zu Prozessen im Membranbioreaktor nur die Konzentrationen im Reaktor dargestellt. Bei Referenzmessungen der Glucose und des Ammoniums im Permeat konnten die gleichen Substratkonzentrationen wie im Reaktor wiedergefunden werden (Daten nicht gezeigt).

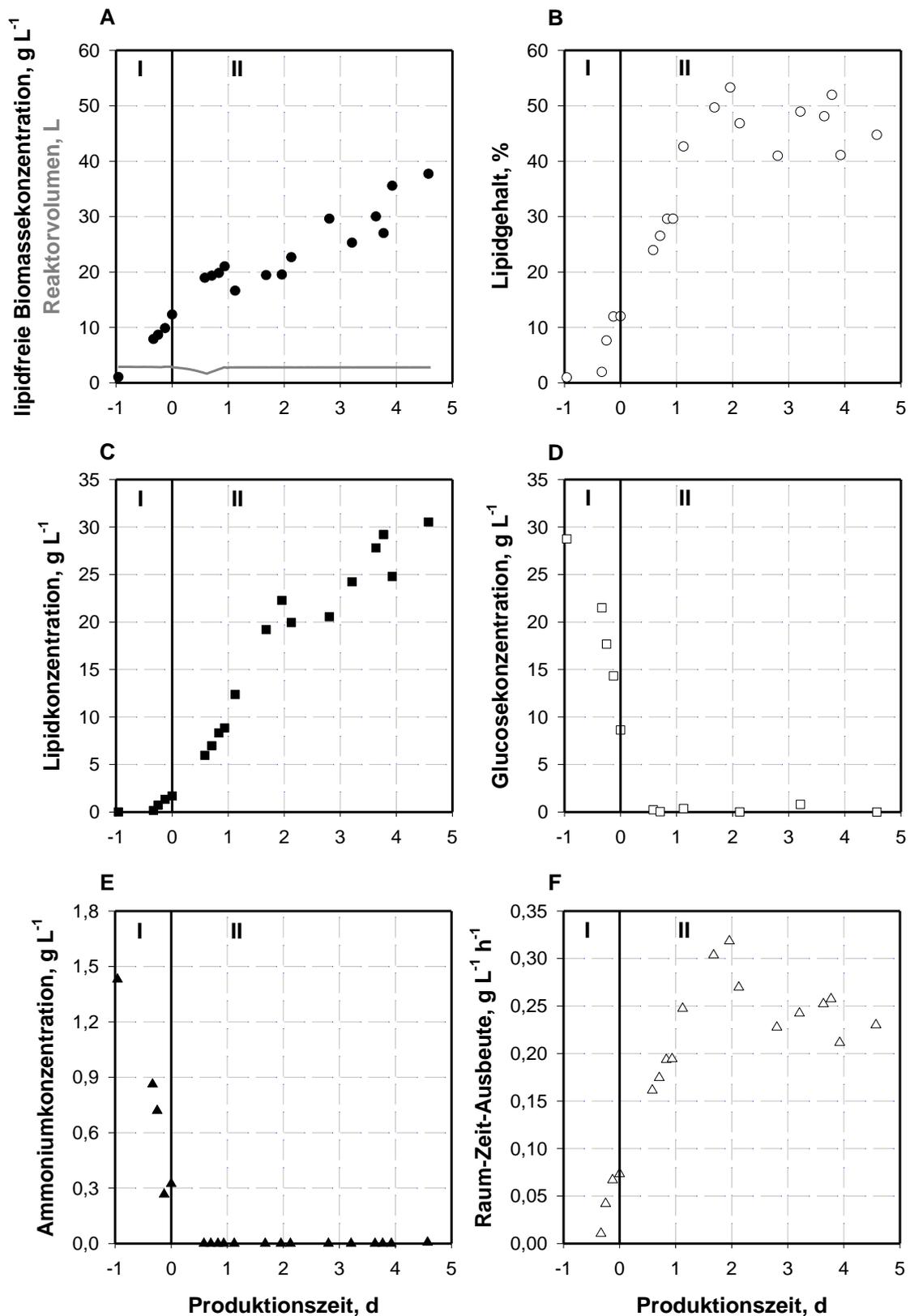


Abbildung 7.1: Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration und des Reaktorvolumens (graue Linie) (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Glucosekonzentration (D), der Ammoniumkonzentration (E) und der Raum-Zeit-Ausbeute (F) eines kontinuierlichen Prozesses mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor mit *T. oleaginosus* im Litermaßstab. Es wurden 30 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g^{-1} vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 800 rpm , 2 L min^{-1} Begasung mit steriler Luft und pH 6,5 über 5,5 d. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 \text{ h}^{-1}$ und C/N 100 g g^{-1} und totaler Zellrückhaltung

7.1.2 Lipidproduktion unter N-Limitierung mit einem Zuckergemisch als Substrat

Im Hinblick auf den Einsatz von Algenhydrolysat, welches immer ein Gemisch aus Zuckern darstellt, wurde im Anschluss eine Kultivierung mit totaler Zellrückhaltung unter Stickstofflimitierung mit einem Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose) durchgeführt (Abbildung 7.2). Zwischen der Satzphase mit C/N 15 g g⁻¹ und Produktionsphase mit C/N 100 g g⁻¹ wurde eine Wachstumsphase mit C/N 15 g g⁻¹ für 24 h geschaltet. Ziel war die Erhöhung der Zellkonzentration vor Beginn der Lipidproduktion.

Durch die zusätzliche Wachstumsphase (II) konnte die lipidfreie Biomassekonzentration zu Beginn der Produktionsphase von 12,3 g L⁻¹ auf 24,9 g L⁻¹ im Vergleich zum vorherigen Versuch verdoppelt werden. Zum Prozessende nach 3,1 d Produktionszeit beziehungsweise 4,7 d Prozesszeit lag die lipidfreie Biomassekonzentration jedoch mit 34,8 g L⁻¹ in einem ähnlichen Bereich wie im vorherigen Versuch zur selben Prozesszeit (30,0 g L⁻¹ bei 4,5 d). Was in Abbildung 7.2 A vor allem auffällt, sind die starken Schwankungen und das Abflachen im Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration ab 2 d Produktionszeit. Dies ist auf eine Abnahme des Permeatflusses aufgrund von *Fouling* und folglich einer Volumenzunahme im Reaktor zurückzuführen (siehe Abbildung 7.2 A). Da das Reaktorgewicht online aufgezeichnet wurde, sind die gezeigten Konzentrationen ab 2 d Produktionszeit alle auf das ursprüngliche Volumen von 2,8 L zurückgerechnet worden und in den Abbildungen entsprechend farblich hervorgehoben.

Während der Satz- und Wachstumsphase (I+II) liegt keine Stickstofflimitierung im Medium vor. 1 d nach Beginn der Produktionsphase (III) mit einem stickstofflimitierendem Medium kann kein Ammonium im Reaktor mehr nachgewiesen werden (Abbildung 7.2 E), sodass die Zellen mit der vermehrten Lipidakkumulation beginnen. Der Lipidgehalt steigt von 19 % auf 41 %, die Lipidkonzentration erreicht ihr Maximum mit 24,6 g L⁻¹ am Ende des Prozesses (Abbildung 7.2 B+C). Zwar kommt es zu einer geringen Zunahme des intrazellulären Lipidgehalts von 6 % auf 15 % während der Satz- und Wachstumsphase, aber gleichzeitig nimmt die Zellkonzentration stark zu. So ergibt sich für die Lipidkonzentration auch während nicht stickstofflimitierenden Bedingungen bereits eine Steigerung von 0,1g L⁻¹ auf 4,3 g L⁻¹. Während der Lipidgehalt in diesem Versuch bei 41 % nach 3,1 d Produktionszeit liegt, konnte im vorherigen Versuch ein Lipidgehalt von 49 % nach 3,2 d Produktionszeit erzielt werden.

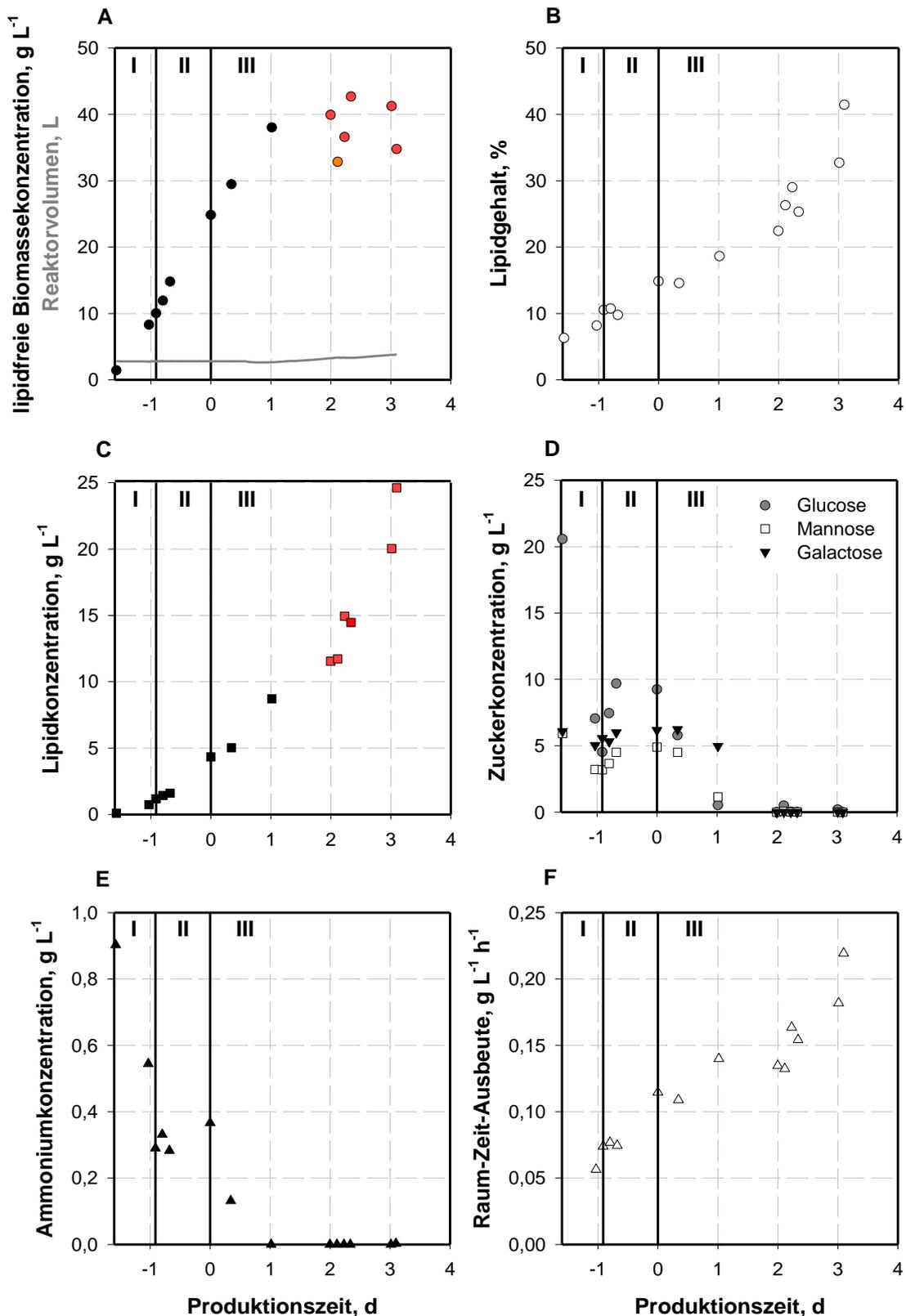


Abbildung 7.2: Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration und des Reaktorvolumens (graue Linie) (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Zuckerkonzentration (D), der Ammoniumkonzentration (E) und der Raum-Zeit-Ausbeute (F) eines kontinuierlichen Prozesses mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor mit *T. oleaginosus* im Litermaßstab. Es wurden 30 g L⁻¹ Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose) in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g⁻¹ vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C, 800 rpm, 2 L min⁻¹ Begasung mit steriler Luft und pH 6,5 über 4,7 d. I Satzphase; II Wachstumsphase mit D = 0,15 h⁻¹ und C/N 15 g g⁻¹ und totaler Zellrückhaltung; III Produktionsphase mit D = 0,075 h⁻¹ und C/N 100 g g⁻¹ und totaler Zellrückhaltung. In rot sind Datenpunkte hervorgehoben, die aufgrund der Volumenzunahme auf das ursprüngliche Volumen von 2,8 L zurück gerechnet wurden.

Durch die höhere Verdünnungsrate von $0,150 \text{ h}^{-1}$ während der Wachstumsphase liegen hier zwischen $13 - 20 \text{ g L}^{-1}$ Gesamtzucker im Medium vor (Abbildung 7.2 D). Diese werden jedoch auch beim Abzug des verbrauchten Mediums aus dem Reaktor entfernt und können nicht mehr für Biomasseaufbau genutzt werden. Daher erfolgt kein kompletter Umsatz der zudosierten Zucker bis 1 d Produktionszeit. Während der Produktionsphase mit einer halb so hohen Verdünnungsrate von $0,075 \text{ h}^{-1}$ sind alle Zucker nach 2 d Produktionszeit im Medium bei $\sim 0 \text{ g L}^{-1}$, sodass anschließend das zugeführte Substrat sofort von den Zellen verbraucht wird.

Die Raum-Zeit-Ausbeute nimmt über die gesamte Prozesszeit zu und zeigt ein Maximum von $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 4,7 d (Abbildung 7.2 F). Über den Gesamtzeitraum betrachtet ist diese somit vergleichbar mit dem Ergebnis des vorherigen Versuchs.

7.1.3 Lipidproduktion unter P-Limitierung mit Glucose als Substrat

Des Weiteren wurde im Hinblick auf den Einsatz von Algenhydrolysat die Lipidproduktion unter Phosphorlimitierung mit Glucose als Substrat untersucht (Abbildung 7.3). Auf eine zusätzliche Wachstumsphase wurde hier verzichtet. Stattdessen startete nach einer Satzphase direkt die Produktionsphase mit $\text{C/N } 5 \text{ g g}^{-1}$, wie es auch für Algenhydrolysat berechnet wurde (siehe Tabelle 6.1).

Während der Satzphase steigt die lipidfreie Biomasse von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ auf $11,9 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 7.3 A). Die anschließende, lineare Zunahme der lipidfreien Biomasse erfolgt deutlich langsamer, sodass nach 5,0 d Produktionszeit (5,7 d Gesamtprozesszeit) eine lipidfreie Biomassekonzentration von $30,7 \text{ g L}^{-1}$ gemessen wird.

Da sowohl im Satz- als auch Zulaufmedium ein C/P-Verhältnis von 3512 g g^{-1} vorlag, nahm der Lipidgehalt bereits in der Satzphase von 4 % auf 21 % zu (Abbildung 7.3 B). Nach Beginn der Produktionsphase steigt die Lipidkonzentration sehr schnell auf 57 % (1,3 d) und flacht dann ab. Zum Prozessende (5,0 d) wird ein maximaler Lipidgehalt von 70 % gemessen. Die Lipidkonzentration hingegen nimmt ab Beginn der Produktionsphase kontinuierlich und linear zu (Abbildung 7.3 C). Unter phosphorlimitierenden Bedingungen konnten in diesem Versuch nach 5,0 d $71,9 \text{ g L}^{-1}$ Lipide produziert werden.

Obwohl die Glucosekonzentration bereits kurz nach Beginn der Produktionsphase auf $\sim 0 \text{ g L}^{-1}$ sinkt, nimmt die Lipidkonzentration stetig zu. Das heißt, dass die zugegebene Glucose unmittelbar von den Zellen (für die Lipidproduktion) verbraucht wird und kein überschüssiges Substrat im Permeat verloren geht, was Messungen der Glucosekonzentration im Permeat bestätigten (Daten nicht gezeigt).

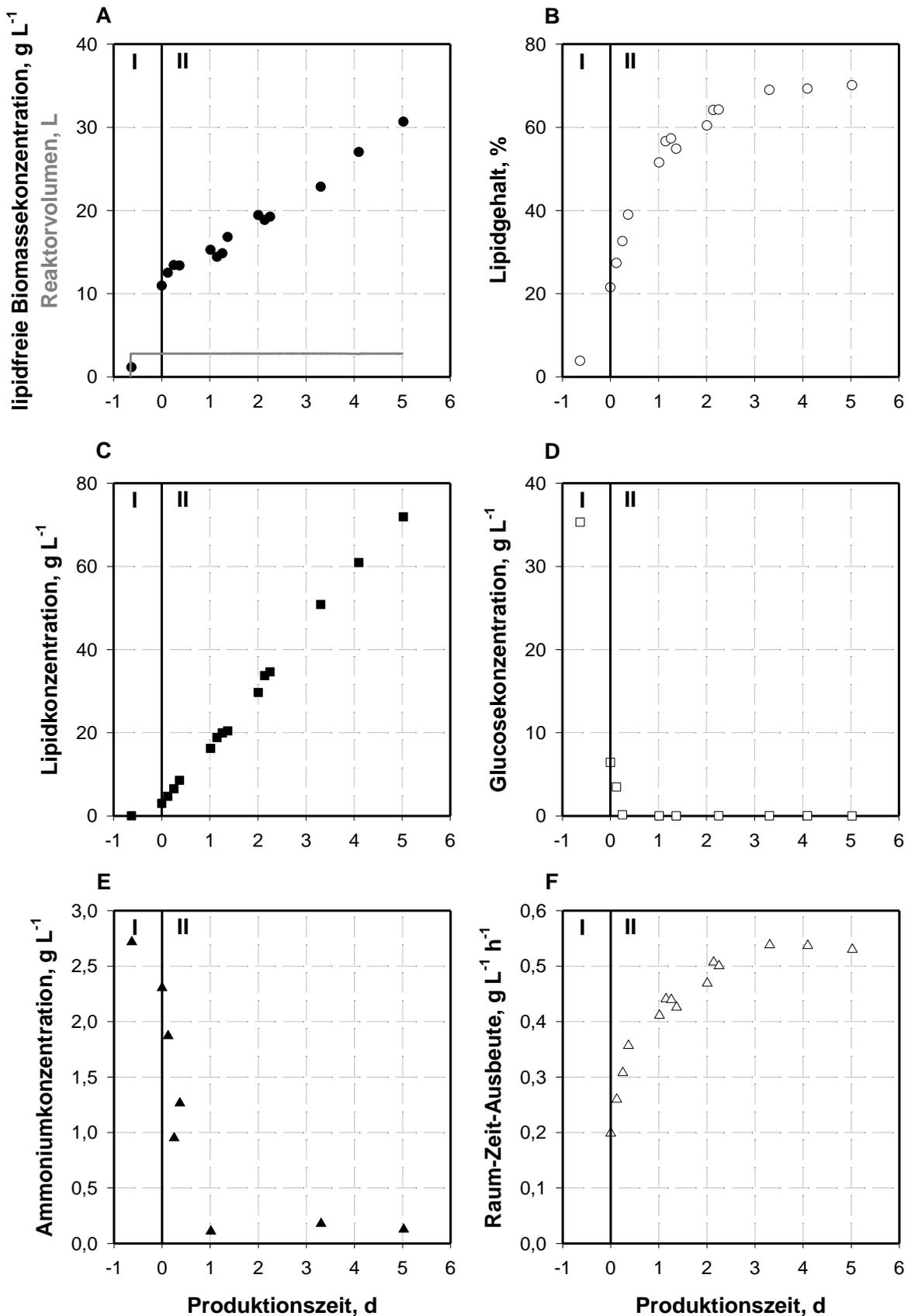


Abbildung 7.3: Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration und des Reaktorvolumens (graue Linie) (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Glucosekonzentration (D), der Ammoniumkonzentration (E) und der Raum-Zeit-Ausbeute (F) eines kontinuierlichen Prozesses von *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung im Litermaßstab. Es wurden 30 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/P-Verhältnis von 3512 g g^{-1} vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 800 rpm , 2 L min^{-1} Begasung mit steriler Luft und pH 6,5 über 5,7 d. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 \text{ h}^{-1}$ und C/P 3512 g g^{-1} und totaler Zellrückhaltung

Abbildung 7.3 E zeigt den Verlauf der Ammoniumkonzentration. Obwohl mit einem C/N-Verhältnis von 5 g g^{-1} ausreichend Stickstoff über den Zulauf zur Verfügung gestellt wird, sinkt die Ammoniumkonzentration nach 1,0 d auf $\sim 0,15 \text{ g L}^{-1}$ ab. Nichtsdestotrotz kann immer Ammonium im Medium nachgewiesen werden, weshalb nicht von einer Stickstofflimitierung ausgegangen wird. Die Phosphatkonzentration im Medium ist aufgrund des hohen C/P-Verhältnisses sehr gering und befindet sich während der Kultivierung zwischen $0,01 \text{ g L}^{-1}$ zu Beginn und $0,001 \text{ g L}^{-1}$ nach 0,4 d bis 3,3 d. Anschließend steigt die Phosphatkonzentration wieder leicht auf $0,01 \text{ g L}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt). Bei so geringen Mengen kann von einer fast kontinuierlichen Phosphatlimitierung während der Kultivierung ausgegangen werden.

Der Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute folgt einer Sättigungskurve, die ihr Maximum von $0,54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 3,3 d Produktionszeit erreicht. Anschließend nimmt die Raum-Zeit-Ausbeute wieder leicht ab (Abbildung 7.3 F).

7.1.4 Lipidproduktion mit vorbehandeltem Algenhydrolysat

Vorversuche zur Phosphatfällung im Algenhydrolysat

Mit Algenhydrolysat als Fermentationsmedium konnte im Satzverfahren keine Lipidbildung beobachtet werden, da keine Nährstofflimitierung auftrat (vergleiche Kapitel 5.1.1). Deshalb wurde das Algenhydrolysat vorbehandelt und das vorhandene Phosphat mit FeCl_3 chemisch gefällt. In Vorversuchen wurden dazu zwei Bedingungen untersucht: zum einen ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 (P:Fe), zum anderen ein stöchiometrischer Überschuss des Fällungsmittels von 1:1,5 (P:Fe). Für beide Bedingungen wurde zusätzlich als Kontrolle ein Phosphatpuffer mit gleicher Ausgangsphosphatkonzentration untersucht. Der pH wurde während der Fällung durch Zugabe von 5 M KOH in einem Bereich von pH 4,5 - pH 5,5 gehalten, was über eine *at-line* pH-Messung kontrolliert wurde.

Abbildung 7.4 zeigt die Phosphatkonzentration und prozentuale Phosphatabreicherung des Ausgangsphosphatgehalts bei zwei untersuchten Bedingungen für Algenhydrolysat und einen Phosphatpuffer als Kontrolle. Im Algenhydrolysat konnte bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (P:Fe) kein signifikanter Unterschied in der Phosphatkonzentration und folglich auch bei der prozentualen Phosphatreduktion festgestellt werden (Abbildung 7.4 schwarze Balken). Bei einem stöchiometrischen Überschuss des Fällungsmittels FeCl_3 konnte der Phosphatgehalt im Algenhydrolysat stärker reduziert werden als in der Kontrolle (Abbildung 7.4 graue Balken). Es wurde eine Abreicherung von 99,85 % erzielt, während in der Kontrolle der Phosphatgehalt um 95,95 % verringert wurde. Nach der Fällung wurde im Algenhydrolysat eine Phosphatkonzentration von $0,02 \text{ g L}^{-1}$ gemessen werden, bei der Kontrolle lag die Phosphatkonzentration bei $0,41 \text{ g L}^{-1}$. Allerdings lag der pH nach der Fällung im Algenhydrolysat bei pH 4,6, während er in der Kontrolle deutlich niedriger bei pH 1,45 lag.

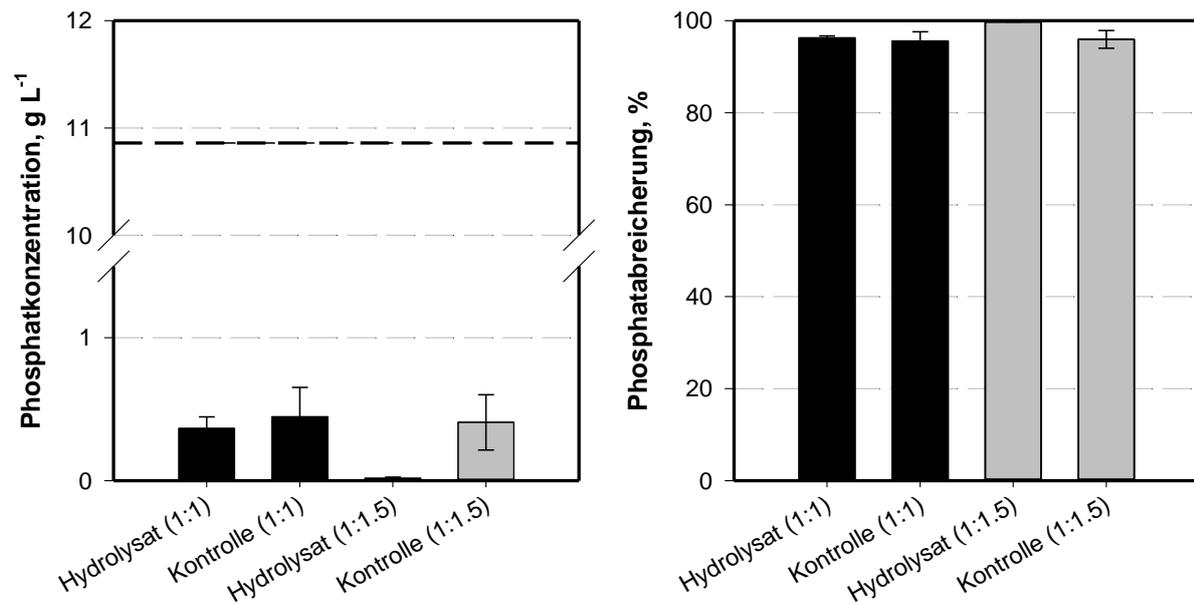


Abbildung 7.4: Phosphatkonzentration (links) und prozentuale Phosphatabreicherung (rechts) in Algenhydrolysat und in Kontrollansätzen ($n = 3$) nach der Phosphatfällung mit FeCl_3 und den Stöchiometrien 1:1 (schwarz) und 1:1,5 (grau) (P:Fe). Die gestrichelte Linie zeigt die Ausgangsphosphatkonzentration im Algenhydrolysat beziehungsweise der Kontrolle.

Hydrolyse und Phosphatfällung der Algenbiomasse im Litermaßstab

Scenedesmus ovalternus wurde als Algenbiomasse verwendet, die freundlicherweise von Anja Koller (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) bereitgestellt wurde. Die Algenbiomasse (2,2 kg Trockenmasse) lag aufgeschlossen und gefriergetrocknet vor und wurde im Rührkesselreaktor mit 250 g L^{-1} bei 1000 rpm, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 2 % (v/v) Enzymgemisch (CellicCTec2® von Novozymes, enthält Cellulasen und Hemicellulasen) in Natriumacetatpuffer (pH 5,5) für 96 h hydrolysiert. Aufgrund oben gezeigter Daten, wurde die Phosphatfällung des Algenhydrolysats im Litermaßstab mit einem stöchiometrischen Überschuss von 1:1,5 (P:Fe) durchgeführt. Hierbei konnte der Phosphatgehalt von ursprünglich $1,62 \text{ g L}^{-1}$ erfolgreich auf $0,11 \text{ g L}^{-1}$ reduziert werden, was einer Abreicherung von 99,36 % entspricht. Damit konnte das C/P-Verhältnis im Algenhydrolysat bei $40,6 \text{ g L}^{-1}$ Gesamtzucker von 324 g g^{-1} auf 4826 g g^{-1} erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

Lipidproduktion mit Algenhydrolysat im Membranbioreaktor

Die Kultivierung mit Algenhydrolysat fand unter identischen Bedingungen wie mit definiertem Medium statt. In Abbildung 7.5 ist deutlich eine stark verlängerte Verzögerungsphase von ~40 h zu erkennen, währenddessen fast kein Zellwachstum zu verzeichnen ist. Ab 64 h Prozesszeit kann ein linearer Anstieg der lipidfreien Biomassekonzentration auf $26,5 \text{ g L}^{-1}$ bis zum Ende nach 93 h Prozesszeit (Abbildung 7.5 A) beobachtet werden. Ebenfalls ist eine Zunahme des Reaktorvolumens zu Prozessende zu erkennen, welche auf eine Abnahme des Permeatflusses aufgrund von *Fouling* zurückzuführen ist.

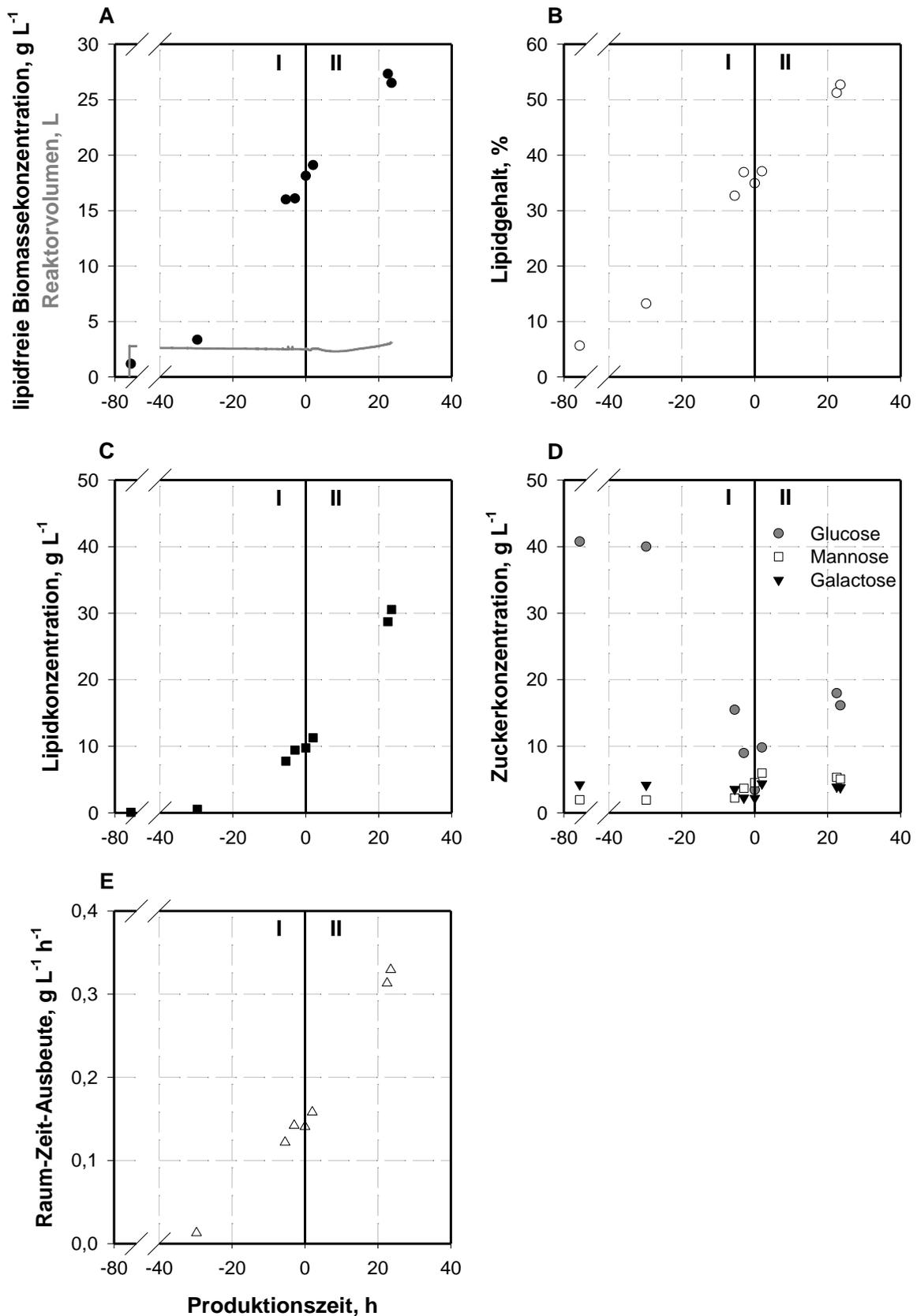


Abbildung 7.5: Verlauf der lipidgefreiten Biomassekonzentration und des Reaktorvolumens (graue Linie) (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Zuckerkonzentration (D) und der Raum-Zeit-Ausbeute (E) eines kontinuierlichen Prozesses von *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung im Litermaßstab. Als Satz- und Zulaufmedium wurde phosphatgefälltes Algenhydrolysat mit einer Gesamtzuckerkonzentration von $40,6 g L^{-1}$ und einem C/P-Verhältnis von $4826 g g^{-1}$ eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei $30\text{ }^{\circ}C$, 800 rpm, $2 L min^{-1}$ Begasung mit steriler Luft über 93 h. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 h^{-1}$ und totaler Zellrückhaltung

Während der Verzögerungsphase nimmt der Lipidgehalt nur gering von anfangs 6 % auf 13 % zu. Eine starke, lineare Zunahme des Lipidgehalts auf 53 % kann jedoch von Beginn bis Ende der Produktionsphase (23,5 h Produktionszeit) gemessen werden (Abbildung 7.5 B). Ein vergleichbarer Wert (51 %) wurde in definiertem Medium mit Phosphorlimitierung ebenfalls nach 24 h Produktionszeit erreicht. Gleichzeitig steigt die Lipidkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ zum Ende der Verzögerungsphase auf $30,6 \text{ g L}^{-1}$ zum Ende des Prozesses an. Da von Beginn der Kultivierung an mit dem phosphatgefällten Algenhydrolysat unter Phosphorlimitierung gearbeitet wurde, kam es bereits während der Satzphase zu einer Zunahme des Lipidgehalts und der Lipidkonzentration, was deutlich in Abbildung 7.5 C zu sehen ist. Mit der Zunahme des Lipidgehalts und der Lipidkonzentration nimmt auch die Raum-Zeit-Ausbeute kontinuierlich bis zum Prozessende zu. Über die gesamte Prozesszeit gesehen beträgt sie $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 7.5 E) und ist somit vergleichbar zu den Resultaten unter Stickstofflimitierung.

Sobald die Zuckerkonzentration im Medium zur Neige ging, wurden der Zulauf sowie der Bypass zur Zellrückhaltung gestartet. So kam es nie zu einer Limitierung der Kohlenstoffquelle im Medium. Im Gegenteil ist in Abbildung 7.5 D zu sehen, dass am Ende des Prozesses sogar noch $25,0 \text{ g L}^{-1}$ Gesamtzucker übrig waren, der Umsatz also unvollständig war. Die Phosphatkonzentration liegt während des Prozesses zwischen $0,014 \text{ g L}^{-1}$ zu Beginn und $0,005 \text{ g L}^{-1}$ zu Prozessende (Daten nicht gezeigt).

7.1.5 Diskussion

Lipidproduktion

Durch den Einsatz eines kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktors mit totaler Zellrückhaltung konnte mit einem niedrig konzentrierten Zulaufmedium (30 g L^{-1} Glucose) unter Stickstofflimitierung ein intrazellulärer Lipidgehalt von 45 % mit *T. oleaginosus* erzielt werden. Wurde stattdessen ein Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose) eingesetzt, lagerte *T. oleaginosus* bis zu 41 % Lipide ein. Damit konnten unabhängig von der eingesetzten Kohlenstoffquelle ähnliche Lipidgehalte sowie Raum-Zeit-Ausbeuten unter Stickstofflimitierung erreicht werden (siehe Tabelle 7.1). Dies verdeutlicht die Eignung der oleogenen Hefe *T. oleaginosus*, Zuckergemische, wie sie nach der Hydrolyse von Polysacchariden aus Mikroalgenbiomasse entstehen, in definiertem Medium effizient zur Lipidproduktion zu nutzen. Beim Vergleich der Lipidproduktion im Membranbioreaktor (niedrig konzentriertes Zulaufmedium) mit Zulaufprozessen (konzentrierte Zuckerlösung) ist zu erkennen, dass bei beiden Betriebsweisen identische Lipidausbeuten erzielt werden. *T. oleaginosus* zeigt folglich unter Stickstofflimitierung eine konstante Umwandlung des dargebotenen Substrats in Lipide, die unabhängig von der Betriebsweise des Reaktors ist. Da in den Zulaufprozessen jedoch ein um den Faktor 16 konzentriertes Zulaufmedium eingesetzt

war, wurden dort bei kürzerer Prozesszeit ein Drittel mehr Lipide intrazellulär eingelagert und die Raum-Zeit-Ausbeute war fast doppelt so hoch.

Tabelle 7.1: Prozessgrößen zum Einsatz von *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor (MBR), in Zulaufprozessen und einem Satzprozess (Daten aus der Literatur). ¹Definiertes Medium mit Glucose, ²Definiertes Medium mit einem Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose), ³ phosphatgefälltes Algenhydrolysat, ⁴Molkenpermeat

Bedingung	Lipidgehalt, % (w/w)	Raum-Zeit- Ausbeute, g L ⁻¹ h ⁻¹	Lipidausbeute, g g ⁻¹	Prozesszeit (Produktionszeit), d	Zuckerkonzentration im Zulaufmedium, g L ⁻¹
MBR: N-Limitierung ¹	45	0,23	0,23	5,5 (4,6)	30
MBR: N-Limitierung ²	41	0,22	-	4,7 (3,1)	30
MBR: P-Limitierung ¹	70	0,53	0,26	5,7 (5,0)	30
MBR: P-Limitierung ³	53	0,33	0,43	3,9 (1,0)	40,6
Zulaufprozesse ¹ im Litermaßstab	68 ± 0	0,44 ± 0,0	0,24 ± 0,01	3,0	500
Satzprozess ⁴ : (Moon et al., 1978)	57	0,29	0,27	3,0	50 (Satzmedium)

Unter phosphorlimitierenden Bedingungen konnten im Membranbioreaktor der höchste Lipidgehalt, die größte Raum-Zeit-Ausbeute und die höchste Lipidausbeute in definierten Medium erzielt werden. Dies ist zunächst überraschend, da bei Zulaufkultivierungen im Millilitermaßstab eine Phosphorlimitierung weniger effektiv als eine Stickstofflimitierung war (siehe Kapitel 6). Da im Medium immer Ammoniumkonzentrationen >0,15 g L⁻¹ nachgewiesen wurden, ist jedoch nicht von einer zusätzlichen Stickstofflimitierung auszugehen. Auch die etwas längere Prozesszeit von 5,0 d im Vergleich zu 4,6 d erklärt den Unterschied in den Prozessgrößen nur zum Teil.

Die in Tabelle 7.1 dargestellten Lipidausbeuten (Y_{LS}) und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) im Membranbioreaktor sind teils deutlich höher als Literaturwerte (Y_{LS} 0,11 - 0,15 g g⁻¹, RZA 0,29 - 0,59 g L⁻¹ h⁻¹), wo bei den zugrunde liegenden Studien *T. oleaginosus* in definiertem Medium mit konzentrierten Glucose- oder Glycerinlösungen in Zulaufverfahren eingesetzt wurde (Hassan et al., 1996; Meesters et al., 1996). Moon et al. (1978) setzten Molkenpermeat, welches durch Ultrafiltration (Porengröße 24 kDa) deproteiniert wurde, als Fermentationsmedium für die Satzkultivierung von *T. oleaginosus* ein und erzielten dadurch eine etwas höhere Lipidausbeute und Raum-Zeit-Ausbeute als im Membranbioreaktor mit definierten Medien und niedrigerer Substratkonzentration im Zulaufmedium. Für andere Hefen, wie zum Beispiel *Rhodospiridium toruloides*, wurden ähnliche Lipidausbeuten

(0,23 g g⁻¹) und Produktivitäten (0,54 - 0,57 g L⁻¹ h⁻¹) wie die hier gezeigten für Zulaufverfahren publiziert (Li et al., 2007; Zhao et al., 2011), obwohl in diesen Studien konzentrierte Substratkonzentrationen (1000 g L⁻¹ Glucose) in den Zulaufmedien verwendet wurden. Für die oleogene Hefe *Cryptococcus curvatus* wurden für einen Zulaufprozess mit 1000 g L⁻¹ Glucose als Zulaufmedium ebenfalls niedrigere Werte (Y_{LS} 0,25 g g⁻¹ und RZA 0,47 g L⁻¹ h⁻¹) berichtet (J. Zhang et al., 2011).

Wurde statt eines definierten Mediums (30 g L⁻¹ Glucose) Algenhydrolysat (40,6 g L⁻¹ Zucker) eingesetzt, ergab sich ein Lipidgehalt von 53 %, der somit höher als unter stickstofflimitierenden Bedingungen, aber geringer als mit Phosphorlimitierung im Membranbioreaktor war. Zu beachten ist hier jedoch, dass es zu einer fast 40 stündigen Verzögerungsphase zwischen Inokulation und Beginn des Zellwachstums kam. Wird in zukünftigen Prozessen mit Algenhydrolysat diese Verzögerung vermieden, könnte sich eine deutlich verbesserte Produktivität von 0,57 g L⁻¹ h⁻¹ ergeben. Da nur eine begrenzte Menge an Algenbiomasse und somit Algenhydrolysat für experimentellen Untersuchungen zur Verfügung stand, konnten keine weiteren Untersuchungen zu Ursachen der langen Verzögerungsphase durchgeführt werden. Bei den zuvor eingesetzten Algenhydrolysaten wurden in Satzprozessen keine Verzögerungsphasen beobachtet.

Weiterhin fällt beim Einsatz von Algenhydrolysat mit Phosphatfällung die hohe apparente Lipidausbeute von 0,43 g g⁻¹ auf. Aus Kapitel 3.3 ist bekannt, dass mit 1 g Glucose als Substrat aufgrund der Stöchiometrie der biochemischen Stoffwechselwege in der Zelle nur 0,33 g Lipide gebildet werden können. Damit liegt die Vermutung nahe, dass in dem komplexen Fermentationsmedium Algenhydrolysat nicht nur die vorhandenen Monosaccharide zur Lipidproduktion genutzt werden, sondern auch etwaige andere Kohlenstoffquellen wie Peptide oder Aminosäuren. So berichten Evans und Ratledge (1984) von einer verbesserten Lipidakkumulation in *Rhodospiridium toruloides* CSB 14, wenn organischer Stickstoff (L-Glutamat) anstelle von anorganischem Stickstoff (Ammoniumchlorid) eingesetzt wird. Durch die ¹⁴C-Markierung von L-Glutamat konnten sie nachweisen, dass 27 % des Kohlenstoffs aus dem L-Glutamat in den Lipiden wiedergefunden wurde. Dennoch wurde die vermehrte Lipidbildung hauptsächlich auf einen generellen, positiven Effekt von organischem Stickstoff auf die metabolische Aktivität der oleogenen Hefen zurückgeführt. Im Allgemeinen wäre dieser positive Effekt hinsichtlich eines wirtschaftlichen Einsatzes von Vorteil, da so eine ganzheitlichere Nutzung von Abfallstoffen möglich wäre.

In der Literatur finden sich verschiedene Publikationen, die den Einsatz von komplexen Fermentationsmedien wie Biomassehydrolysate oder Abwasserströme für die Lipidbildung oleogener Mikroorganismen beschreiben. So wurden zum Beispiel ein Hydrolysat aus Maisresten oder Abwasser aus der Stärkeproduktion erfolgreich zur Lipidproduktion mit *Rhodotorula glutinis* eingesetzt, so dass 34 % beziehungsweise 35 % Lipide mit einer RZA

von $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gebildet wurden (Galafassi et al., 2012; Xue et al., 2010). Weitere pflanzliche Abfallstoffe, die hydrolysiert als Fermentationsmedien verwendet werden, sind beispielsweise Reisstroh (*Trichosporon fermentans* mit Lipidgehalt 40 % und RZA $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Huang et al., 2009)), Tomatenabfälle (*Cunninghamella echinulata* mit Lipidgehalt 43 % und RZA $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fakas et al., 2008)) oder Kaktusfeigen (*Trichosporon oleaginosus* mit Lipidgehalt 46 % und RZA $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Hassan et al., 1995)). Li et al. (2010) produzierten mit *Rhodotorula mucilaginosa* in einem Zulaufverfahren mit definiertem Medium und Stärke aus Maniok 53 % Lipide (RZA: $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Zwar sind in den genannten Studien die berichteten Lipidgehalte mit $>40 \%$ nicht gering, jedoch sind die erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten meist minimal, was eine wirtschaftliche Verwendung in Frage stellt. Mit vorbehandeltem Klärschlamm als Fermentationsmedium erreichten Seo et al. (2012) in einer Studie mit *Cryptococcus curvatus* sogar nur einen Lipidgehalt von 23 % bei einer Produktivität von $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, da hier das C/N-Verhältnis zu niedrig war, um eine bessere Lipidproduktion zu erreichen. Die gleichen Autoren berichten von demselben Phänomen (niedriges C/N-Verhältnis führt zu geringer Lipidproduktion) beim Einsatz eines Fermentationsmediums aus *Chlorella*-Pulver (*Cryptococcus curvatus* mit Lipidgehalt 21 % und RZA $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), schlagen jedoch keine Lösung vor (Seo et al., 2014). Das Problem des hohen Stickstoffgehalts im Algenhydrolysat wurde in dieser Arbeit erfolgreich gelöst, indem statt einer Stickstofflimitierung durch chemische Phosphatfällung phosphorlimitierende Bedingungen zur Induktion der Lipidakkumulation geschaffen wurden.

Fettsäurezusammensetzung

Das Fettsäurespektrum (siehe Tabelle 7.2) zeigt ein einheitlicheres Bild zwischen den einzelnen Versuchen. Bei allen Bedingungen, sei es im Membranbioreaktor oder im Zulaufprozess, bei Stickstoff- oder Phosphorlimitierung, ist die am häufigsten vorkommende Fettsäure Ölsäure (C18:1). Sie macht dabei meist zwischen 43,0 % und 53,6 % der hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren aus. Neben Ölsäure kommen auch Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0) und Linolsäure (C18:2) (in absteigender Menge) als Fettsäuren vor. In Spuren werden Myristinsäure (C14:0) und Linolensäure (C18:3) gefunden. Interessant ist, dass bei den dargestellten Versuchen immer mehr ungesättigte als gesättigte Fettsäuren eingelagert werden. Es gibt nur eine Ausnahme, bei der das Sättigungsverhältnis in die andere Richtung geht. Dies ist eine Kultivierung im Membranbioreaktor unter Stickstofflimitierung und mit einem Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose) als Substrat. Hier werden mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren gebildet. Dies ist jedoch weder auf den Einsatz eines Zuckergemisches zurückzuführen, denn auch im Algenhydrolysat sind dieselben Zucker als Gemisch vorhanden, noch auf die Art der Limitierung, da in den anderen Versuchen mit einer Stickstofflimitierung ebenfalls mehr ungesättigte Fettsäuren produziert werden. Da dieser Versuch allerdings noch mit einem leicht veränderten Versuchsaufbau des

Membranbioreaktors stattfand, in dem die Bypass-Strecke noch deutlich länger war und die Zellen sich demnach durchschnittlich länger außerhalb des Reaktors unter nicht optimalen Bedingungen aufhielten als bei den anderen gezeigten Versuchen, könnte dies die Unterschiede im Sättigungsverhältnis erklären. Das veränderte Fettsäurespektrum mit der vermehrten Bildung gesättigter Fettsäuren sowie Berechnungen zum Sauerstoffbedarf der oleogenen Hefen während der Lipidbildung ergaben eine mögliche Sauerstofflimitierung der Zellen im Bypass. Eine Sauerstofflimitierung kann auch das lineare Wachstum in Abbildung 7.2 A während der Wachstumsphase erklären, da dort alle anderen Substrate wie Zucker oder Ammonium noch vorhanden waren. Für *T. oleagnosus* konnte in einer früheren Studie bereits gezeigt werden, dass eine Sauerstofflimitierung zu einer Abnahme des Anteils ungesättigter Fettsäuren führt (Davies et al., 1990).

Tabelle 7.2: Übersicht der Fettsäurezusammensetzung und des Verhältnisses zwischen gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren bei der Lipidproduktion mit *T. oleagnosus* im Membranbioreaktor (MBR), im Zulaufprozesse (Referenz) und Daten aus der Literatur. ¹Definiertes Medium mit Glucose, ²Definiertes Medium mit einem Zuckergemisch (60 % Glucose, 20 % Mannose, 20 % Galactose) ³phosphatgefälltes Algenhydrolysat, ⁴Molkenpermeat. (n.a. = nicht angegeben)

Bedingung	Hauptsächlich vorkommende Fettsäuren, % (w/w)						Sättigungsverhältnis
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
MBR: N-Limitierung ¹	0,3	21,5	21,7	43,0	13,1	0,4	1:1,3
MBR: N-Limitierung ²	0,3	21,0	33,5	34,4	10,3	0,4	0,8:1
MBR: P-Limitierung ¹	0,7	25,9	15,4	53,6	3,6	0,9	1:1,4
MBR: P-Limitierung ³	0,5	30,1	14,1	47,2	6,4	1,7	1:1,2
Zulaufprozesse ¹ im Litermaßstab (Referenz)	0,1 ± 0,2	29,5 ± 0,3	15,4 ± 0,0	46,1 ± 0,3	8,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1:1,2
Satzprozess ⁴ : (Moon et al., 1978)	0	32	15	44	8	n.a.	1:1,1

Das Fettsäurespektrum der oleogenen Hefe *T. oleagnosus* zeigt sich generell sehr vorteilhaft, beispielsweise für die Weiterverarbeitung zu Biodiesel (FAMEs mit C16 - C18-Kettenlänge) oder Biokerosin (Kohlenwasserstoffe mit C9 - C16-Kettenlänge).

7.2 Maßstabsübertragung

Zwei Prozesse aus dem Labormaßstab (<3 L) wurden in den 30 L-Maßstab am TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie übertragen, um zum einen die Möglichkeit einer

Maßstabsvergrößerung zu zeigen und um zum anderen lipidhaltige Hefebiomasse zu generieren. Hierbei wurden mit Glucose als Substrat unter Stickstoff- beziehungsweise Phosphorlimitierung Lipide mit *T. oleaginosus* produziert.

Voraussetzung für die Maßstabsvergrößerung ist die vorliegende, geometrische Ähnlichkeit der Rührkesselreaktoren im Labormaßstab und 30 L-Maßstab. Als Randbedingung wurde das Verhältnis zwischen Arbeitsvolumen im Reaktor zum Bypassvolumen gleich gehalten. Zudem wurde die mittlere, hydraulische Verweilzeit der Zellen im Bypass beziehungsweise im Reaktor unter der Annahme, dass das Verweilzeitverhalten im Bypass in beiden Maßstäben identisch ist, konstant gehalten, sodass die Mikroorganismen in beiden Maßstäben möglichst gleich lang die optimalen Bedingungen im Reaktor erfahren und nur kurz im Bypass den Stressbedingungen ausgesetzt sind. Unterschiedlich ist die Membranfläche bezogen auf das Arbeitsvolumen, die im 3 L-Maßstab 1,5-fach größer war als im 30 L-Maßstab, da dort nicht mehr Filterfläche zur Verfügung stand. Ein weiterer Unterschied war der Überdruck von 1 bar im 30 L-Maßstab, um die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium zu erhöhen und somit eine mögliche Sauerstofflimitierung der Zellen im Bypass zu umgehen (siehe Kapitel 7.1.5). Als Skalierungskriterium wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration gewählt, die in beiden Systemen im Reaktor immer >20 % gehalten wurde.

7.2.1 Lipidproduktion unter N-Limitierung mit Glucose als Substrat

Zuerst wurde eine Maßstabsvergrößerung unter stickstofflimitierenden Bedingungen in definiertem Medium mit Glucose als Substrat durchgeführt (Abbildung 7.6). Nach einer Satzphase (I) von 16 h über Nacht wurden der Zulauf (II) von frischem Medium mit einer Verdünnungsrate von $0,065 \text{ h}^{-1}$ sowie der Bypass zum Medienabzug bei totaler Zellrückhaltung gestartet.

Die lipidfreie Biomassekonzentration nimmt bereits während der Satzphase von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $13,6 \text{ g L}^{-1}$ zu und steigt dann weiterhin linear bis circa 0,7 d Produktionszeit. Ab diesem Zeitpunkt flacht die Kurve stark ab, sodass am Ende der Produktionszeit nach 3,8 d eine lipidfreie Biomassekonzentration von $32,2 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Nach 1,7 d Produktionszeit kam es allerdings immer wieder zu einer Abnahme des Permeatflusses aufgrund von *Fouling*. Das *Fouling* führte zu einem Anstieg des Transmembrandrucks im Membranmodul, weshalb die Pumprate der Bypasspumpe kurzzeitig gedrosselt wurde, bis sich der Druck wieder reduzierte. Dadurch wurde weniger Permeat aus dem Reaktor abgeführt und das Reaktorvolumen stieg an, sodass die Werte der Biomassekonzentration auf das ursprüngliche Volumen korrigiert wurden. Diese korrigierten Werte sind in den Abbildungen farbig hervorgehoben. Außerdem verlängerte sich durch die reduzierte Pumprate der Bypasspumpe die theoretische, mittlere hydraulische Verweilzeit der Zellen im Bypass von 10 s auf maximal 15 s.

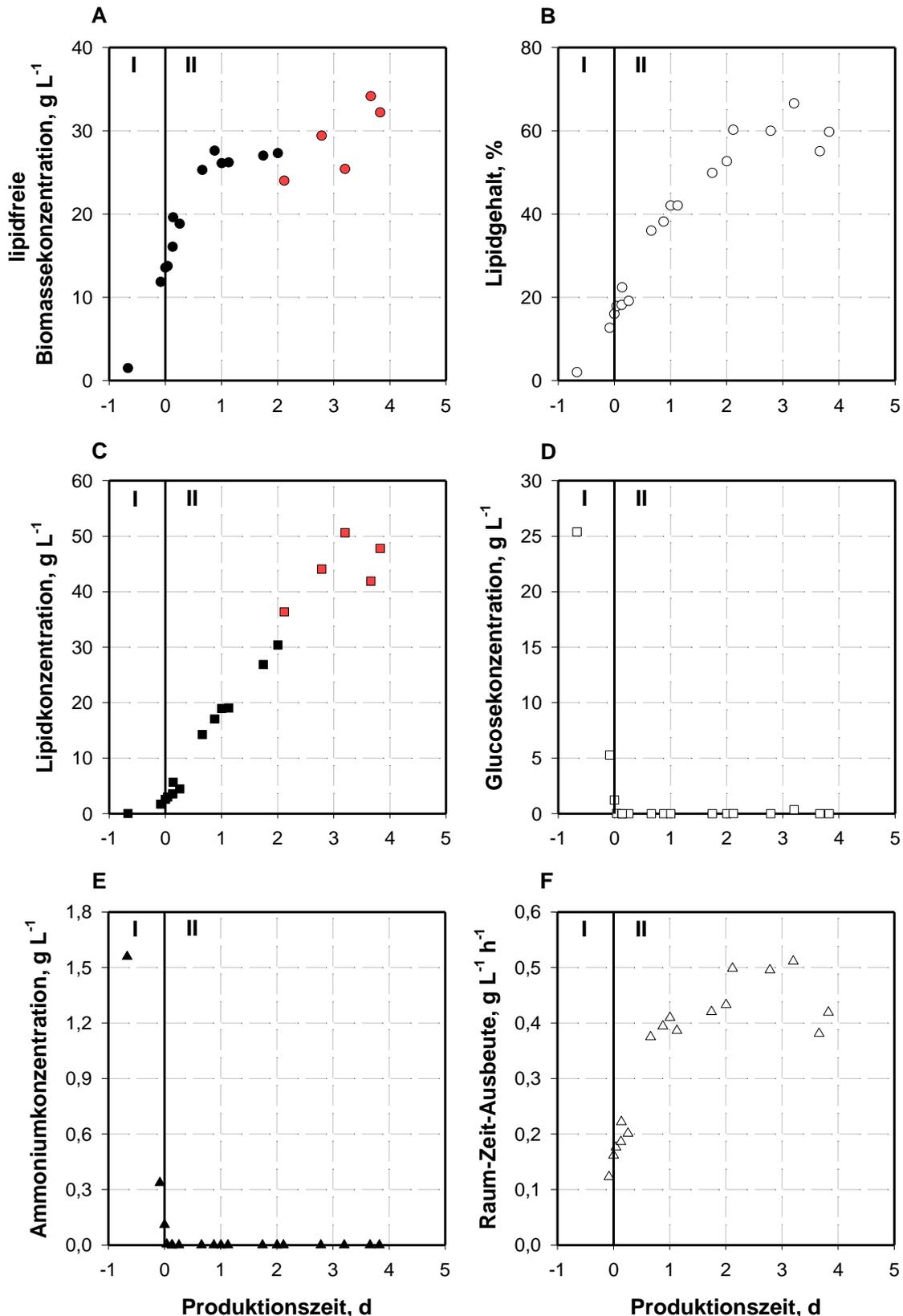


Abbildung 7.6: Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Glucosekonzentration (D), der Ammoniumkonzentration (E) und der Raum-Zeit-Ausbeute (F) bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *T. oleaginosus* mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor im 30 L-Maßstab. Es wurden 30 g L⁻¹ Glucose in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g⁻¹ vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C, 400 rpm, 18 L min⁻¹ Begasung mit steriler Luft, 2 bar und pH 6,5 über 4,6 d. I Satzphase; II Produktionsphase mit D = 0,065 h⁻¹ und C/N 100 g g⁻¹ und totaler Zellrückhaltung. In rot sind Datenpunkte hervorgehoben, die aufgrund der Volumenzunahme auf das ursprüngliche Volumen von 30 L zurück gerechnet wurden.

Der Lipidgehalt nimmt während der Satzphase, in der am Ende noch Ammoniumkonzentrationen $>0,1 \text{ g L}^{-1}$ im Medium nachgewiesen werden (Abbildung 7.6 E), von 2 % auf 16 % zu. Erst im Anschluss nach 0,1 d Produktionszeit, als kein Ammonium im Medium mehr gemessen wird, steigt der Lipidgehalt weiter stark an und erreicht am Ende 60 %. Jedoch schwanken die Messwerte des letzten Produktionstages sehr. Es kann daher angenommen werden, dass der Lipidgehalt zu Prozessende in etwa stagniert (Abbildung 7.6 B). Die Lipidkonzentration beginnt erst ab Produktionsstart linear zu steigen und erreicht zu Prozessende $40,8 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 7.6 C).

Analog zum Verlauf der Lipidkonzentration verhält sich auch der Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute, welche zum Zeitpunkt der maximalen Lipidkonzentration nach 3,2 d auch maximal wird ($0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aber über den Gesamtzeitraum betrachtet $0,42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beträgt (Abbildung 7.6 F). Die Datenpunkte der Lipidkonzentration schwanken ebenso wie die lipidfreie Biomassekonzentration zu Prozessende aufgrund der Zunahme des Reaktorvolumens und des *Fouling*s im Membranmodul. Die Glucosekonzentration im Reaktor fiel während der Satzphase bereits auf $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ab und stagnierte bis zum Ende bei $\sim 0 \text{ g L}^{-1}$, sodass die komplette zugeführte Glucose unmittelbar verbraucht wurde.

7.2.2 Lipidproduktion unter P-Limitierung mit Glucose als Substrat

Ein Prozess mit *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor unter phosphorlimitierenden Bedingungen im 30 L-Maßstab ist in Abbildung 7.7 gezeigt. Die weiteren Reaktionsbedingungen waren $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm, 18 L min^{-1} Begasung, pH 6,5 und 2 bar. Nach einer Satzphase (I) von 20 h wurden der Zulauf (II) von frischem Medium mit einer Verdünnungsrate von $0,065 \text{ h}^{-1}$ sowie der Bypass zum Medienabzug bei totaler Zellrückhaltung gestartet.

Während der Satzphase kommt es zu einer linearen Zunahme der lipidfreien Biomassekonzentration von $1,7 \text{ g L}^{-1}$ auf $8,7 \text{ g L}^{-1}$, da die Zellen von Beginn an nur geringe Mengen an Phosphor zur Verfügung hatten. Ab Beginn der Produktionsphase erfolgt nur noch geringes Wachstum, sodass am Ende $11,3 \text{ g L}^{-1}$ lipidfreie Biomasse vorliegen. Die Biomasse schwankt während der Produktionsphase zwischen 9 - 14 g L^{-1} .

Im Gegensatz zur Kultivierung unter Stickstofflimitierung steigt der Lipidgehalt bereits während der Satzphase auf 39 %, und nach 3,8 d Produktionszeit wird ein Maximum von 83 % erreicht (Abbildung 7.7 B). Nach circa 1 d Produktionszeit endet die lineare Zunahme des Lipidgehalts, die Kurve nähert sich einem Sättigungswert. Bereits während der Satzphase konnte eine lineare Zunahme der Lipidkonzentration auf $5,5 \text{ g L}^{-1}$ verzeichnet werden. Anschließend steigt die Lipidkonzentration weiter linear bis zu einem Maximum von $56,7 \text{ g L}^{-1}$ zu Prozessende an (Abbildung 7.7 C).

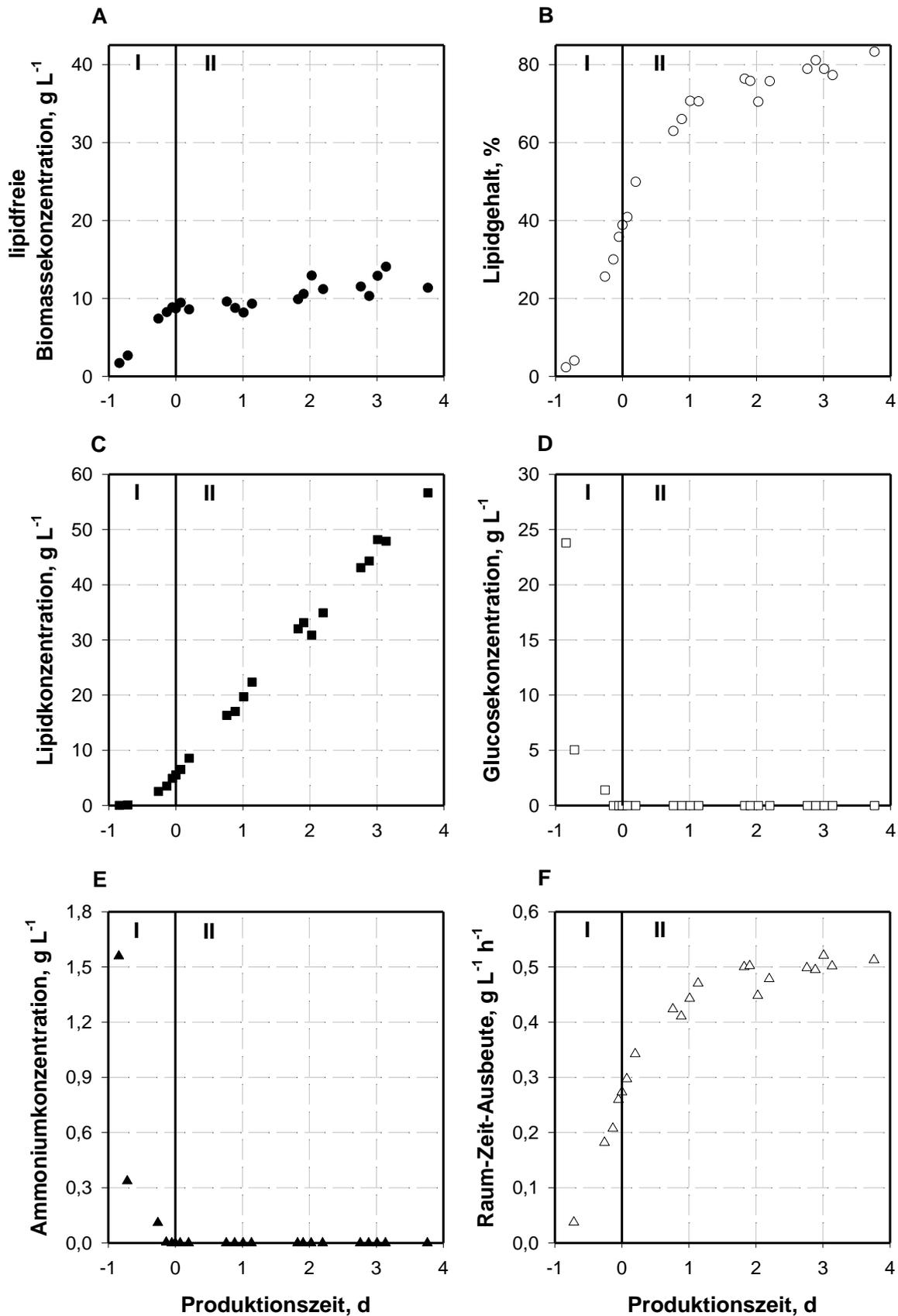


Abbildung 7.7: Verlauf der lipidfreien Biomassekonzentration (A), des Lipidgehalts (B), der Lipidkonzentration (C), der Glucosekonzentration (D), der Ammoniumkonzentration (E) und der Raum-Zeit-Ausbeute (F) bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *T. oleaginosus* mit totaler Zellerückhaltung im Membranbioreaktor im 30 L-Maßstab. Es wurden 30 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/P-Verhältnis von 3512 g g^{-1} vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm , 18 L min^{-1} Begasung mit steriler Luft, 2 bar und $\text{pH } 6,5$ über $4,6 \text{ d}$. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 \text{ h}^{-1}$ und C/P 3512 g g^{-1} und totaler Zellerückhaltung

Für die beiden Substrate Glucose (Abbildung 7.7 D) und Ammonium (Abbildung 7.7 E) ist bereits zum Ende der Satzphase nach 0,7 d Laufzeit eine Abnahme der Substratkonzentrationen bis auf $\sim 0 \text{ g L}^{-1}$ zu erkennen. Anschließend werden beide Substrate sofort nach Zugabe verbraucht, da die Konzentration im Medium weiter bei 0 g L^{-1} bleibt. Die Phosphatkonzentration liegt zwischen $0,001 \text{ g L}^{-1}$ und $0,01 \text{ g L}^{-1}$, also nahe an der Nachweisgrenze, weshalb die Daten nicht gezeigt sind. Die Zellen sind somit von Beginn an einer Phosphorlimitierung ausgesetzt und zusätzlich in der Produktionsphase auch einer Stickstofflimitierung.

Der Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute folgt einer Sättigungskurve. Nach 1,1 d Produktionszeit nimmt die Raum-Zeit-Ausbeute nur noch gering zu, erreicht ihr Maximum ($0,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nach 3,0 d und beträgt über die Gesamtzeit $0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Auch während dieser Kultivierung im Membranbioreaktor im 30 L-Maßstab kam es nach einer Prozesszeit von 4,6 d zu einer Abnahme des Permeatflusses aufgrund von Fouling, sodass nur die Ergebnisse bis zu diesem Zeitpunkt gezeigt sind.

Abbildung 7.8 zeigt zwei Aufnahmen von Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Links sind Zellen zu Prozessbeginn nach Inokulation und rechts Zellen nach 4,6 d Prozesszeit dargestellt. Während die Hefen nach Inokulation noch eher länglich sind und keine intrazelluläre Lipideinlagerung aufweisen, zeigen die Zellen rechts im Schnitt ein bis zwei große *lipid bodies*, in denen die Lipide eingelagert sind. Die Hefen besitzen hier einen intrazellulären Lipidgehalt von 83 %, sodass ein Großteil des intrazellulären Raums von den Speicherlipiden eingenommen ist.

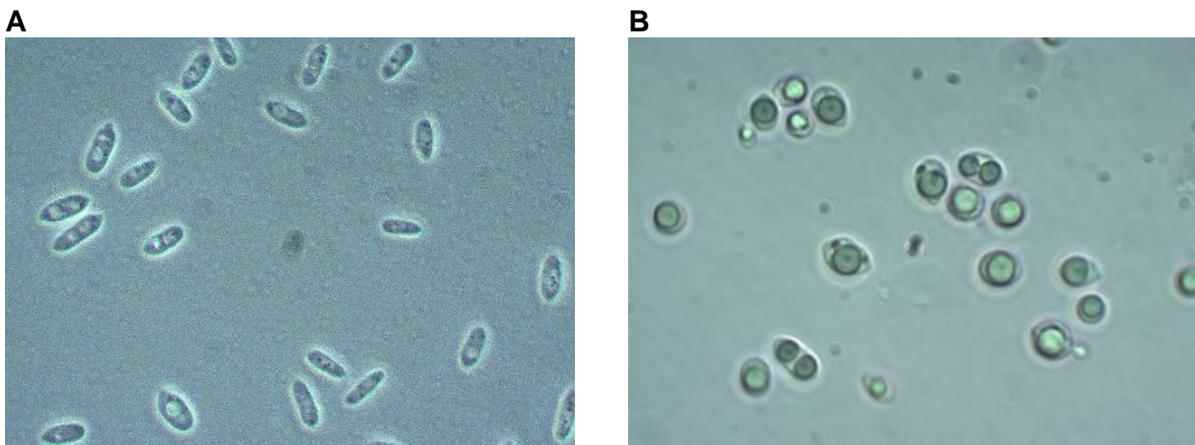


Abbildung 7.8: Zellen der Hefe *Trichosporon oleaginosus* unter dem Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung zu Beginn eines Prozesses ohne Lipideinlagerung (A) und am Ende mit 83 % Lipidgehalt und großen Lipidtröpfchen (*lipid bodies*) (B).

7.2.3 Diskussion

Bei den Prozessen im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung im 30 L-Maßstab wurden von *T. oleaginosus* mehr Lipide unter Phosphorlimitierung als unter Stickstoffunterlimitierung eingelagert. Im Vergleich zu einem Lipidgehalt von 60 % unter Stickstofflimitierung werden bis zu 83 % Lipide bei phosphorlimitierenden Bedingungen akkumuliert. Auch die Lipidkonzentration liegt dort etwas höher, was in einer circa 20 % höheren Raum-Zeit-Ausbeute resultiert. Jedoch kam es bei dem Prozess unter Stickstofflimitierung zum Prozessende zu *Membranfouling* und dadurch zu einer Zunahme des Reaktorvolumens, weshalb gerade die Endwerte für die Biomasse- und Lipidkonzentration ungenauer sind.

Bei der Lipidproduktion unter Phosphorlimitierung wurde zudem während der Produktionsphase kein Ammonium im Medium mehr nachgewiesen, weshalb von einer zusätzlichen Stickstofflimitierung ausgegangen werden kann. Wirken beide Limitierungen synergistisch, könnte dies die im Membranbioreaktor erhöhte Lipidproduktion erklären. Gill et al. (1977) und Kolouchová et al. (2016) beschreiben diesen Effekt ebenfalls und berichten, dass unter Phosphor- und Stickstofflimitierung höhere Lipidgehalte erzielt wurden als unter reiner Stickstofflimitierung. Für den Einsatz einer Stickstoff- und Magnesiumlimitierung wurde bei der oleogenen Hefe *Yarrowia lipolytica* ebenfalls ein synergistischer Effekt auf die Lipidbildung beschrieben (Bellou et al., 2016).

7.3 Vergleich zwischen den Maßstäben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Lipidproduktion im Membranbioreaktor im 2,8 L- und im 30 L-Maßstab verglichen (Kapitel 7.1 und 7.2). Die erreichten Prozessgrößen werden auch in einer Übersicht in Tabelle 7.3 gegenüber gestellt.

7.3.1 Lipidproduktion unter N-Limitierung

Unter stickstofflimitierenden Bedingungen konnte in beiden Maßstäben während der Satzphase eine Zunahme der Biomassekonzentration auf 12 - 13 g L⁻¹ erreicht werden. Die Verläufe der lipidhaltigen Biomassekonzentrationen sind in beiden Maßstäben während der Satzphase noch sehr ähnlich. Ab Beginn der Produktionsphase wird im 30 L-Maßstab mehr lipidhaltige Biomasse gebildet als im 2,8 L-Maßstab. Zum Prozessende unterscheiden sich die Biomassekonzentrationen um ~15 g L⁻¹ (Abbildung 7.9 A).

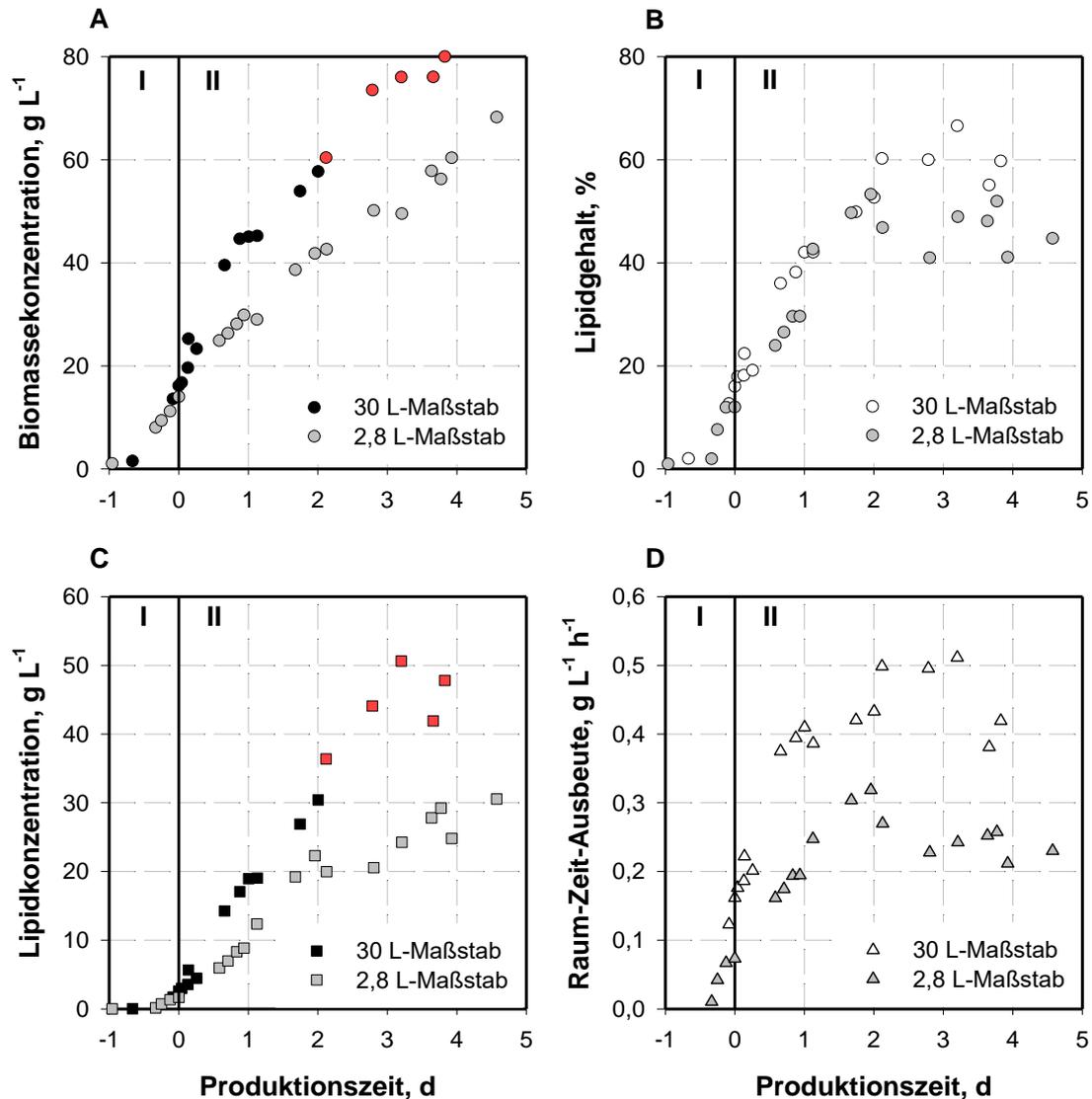


Abbildung 7.9: Vergleich der Biomassekonzentrationen (A), Lipidgehalte (B), Lipidkonzentrationen (C) und Raum-Zeit-Ausbeuten (D) bei der kontinuierlichen Kultivierung von *T. oleaginosus* mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor im 30 L-Maßstab und im 2,8 L-Maßstab (graue Symbole). Es wurden 30 g L⁻¹ Glucose in einem definierten Medium mit einem C/N-Verhältnis von 15 g g⁻¹ vorgelegt. Die Reaktionsbedingungen im 2,8 L-Maßstab sind: 30 °C, 800 rpm, 2 L min⁻¹ Begasung mit steriler Luft und pH 6,5 über 5,5 d. Die Reaktionsbedingungen im 30 L-Maßstab sind: 30 °C, 400 rpm, 18 L min⁻¹ Begasung mit steriler Luft, 2 bar und pH 6,5 über 4,6 d. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 \text{ h}^{-1}$ und C/N 100 g g⁻¹ und totaler Zellrückhaltung. In rot sind Datenpunkte hervorgehoben, die aufgrund der Volumenzunahme auf das ursprüngliche Volumen von 30 L zurück gerechnet wurden.

Im 30 L-Maßstab wird ein um ein Viertel höherer Lipidgehalt erreicht, weshalb auch die Lipidkonzentration um den Faktor 1,6 höher liegt (Abbildung 7.9 B+C). Damit liegt auch die maximale Raum-Zeit-Ausbeute um bis zu Faktor 2 höher (Abbildung 7.9 D). Allerdings zeigen die Werte teils große Messungenauigkeiten gerade zum Prozessende, weshalb der Vergleich der Enddaten nur mit Vorsicht gezogen werden kann. In beiden Maßstäben wird spätestens 0,6 d nach Produktionsstart sowohl kein Ammonium als auch keine Glucose im Medium mehr nachgewiesen (Daten nicht vergleichend dargestellt). Das bedeutet, dass ab diesem Zeitpunkt davon ausgegangen werden kann, dass die zugeführte Glucose unmittelbar in Lipide

umgewandelt wird. Zudem geht keine überschüssige Kohlenstoffquelle über das Permeat verloren, sondern es erfolgt ein vollständiger Umsatz des Zuckers.

7.3.2 Lipidproduktion unter P-Limitierung

Unter phosphorlimitierenden Bedingungen verlaufen in beiden Maßstäben die lipidhaltigen Biomassekonzentrationen bis zu 1,5 d Produktionszeit fast identisch. Anschließend wird im 2,8 L-Maßstab etwas mehr Biomasse gebildet als im 30 L-Maßstab (Abbildung 7.10 A). Für die Lipidbildung sind sehr ähnliche Werte zwischen den beiden Maßstäben hinsichtlich den Raum-Zeit-Ausbeuten zu erkennen. Auch die Lipidkonzentration nach circa 4,0 d liegt mit 61 g L^{-1} beziehungsweise 57 g L^{-1} in einem vergleichbaren Bereich (Abbildung 7.10 C+D).

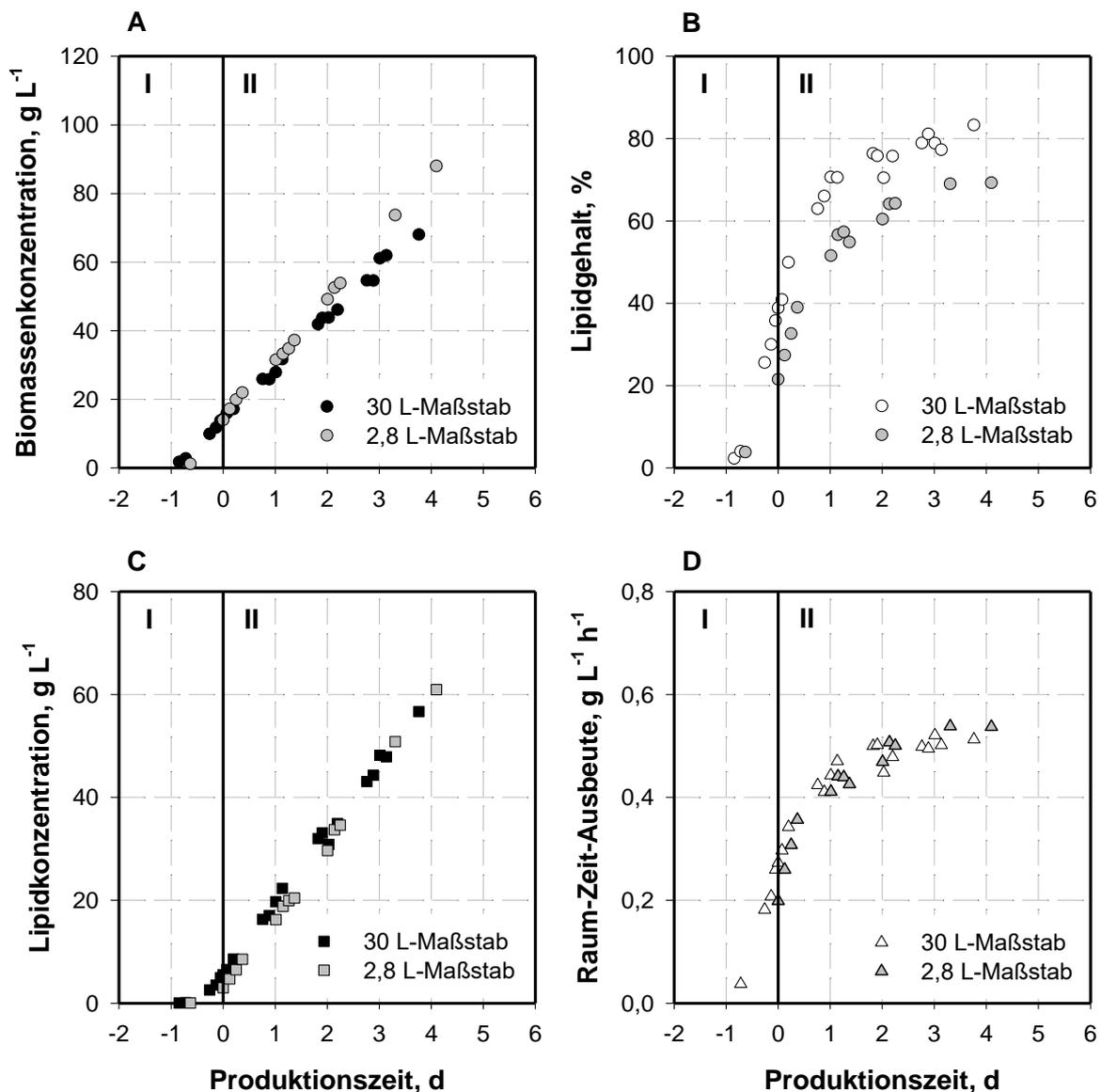


Abbildung 7.10: Vergleich der Biomassekonzentrationen (A), Lipidgehalte (B), Lipidkonzentrationen (C) und Raum-Zeit-Ausbeuten (D) bei der kontinuierlichen Kultivierung von *T. oleaginosus* mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor im 30 L-Maßstab und im 2,8 L-Maßstab (graue Symbole). Es wurden 30 g L^{-1} Glucose in einem definierten Medium mit einem C/P-Verhältnis von 3512 g g^{-1} vorgelegt. Die Reaktionsbedingungen im 2,8 L-Maßstab sind: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 800 rpm , 2 L min^{-1} Begasung mit steriler Luft und pH 6,5 über 5, d. Die Reaktionsbedingungen im 30 L-Maßstab sind: bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm , 18 L min^{-1} Begasung mit steriler Luft, 2 bar und pH 6,5 über 5 d. I Satzphase; II Produktionsphase mit $D = 0,065 \text{ h}^{-1}$ und C/P 3512 g g^{-1} und totaler Zellrückhaltung.

Außerdem nahm der Lipidgehalt in beiden Maßstäben bis 1 d Produktionszeit linear zu und knickte dann im Verlauf ab. Im 30 L-Maßstab nahm der Lipidgehalt jedoch schneller zu, so dass am Ende ein um 16 % höherer Lipidgehalt gemessen wurde. Die zugeführte Glucose wurde in beiden Maßstäben während der Produktionsphase unmittelbar verbraucht, so dass stets ein vollständiger Umsatz erfolgte. Während im 2,8 L-Maßstab noch geringe Mengen ($\sim 0,1 \text{ g L}^{-1}$) Ammonium im Medium nachgewiesen werden konnten, war im größeren Maßstab bereits zum Ende der Satzphase das vorgelegte Ammonium verbraucht. Des Weiteren wurde das zugeführte Ammonium stetig verbraucht und lag folglich im Medium unter der Nachweisgrenze (Daten nicht vergleichend dargestellt). Da Phosphor in beiden Maßstäben zu jedem Zeitpunkt limitierend war, lag im 30 L-Maßstab ab der Produktionsphase eine Doppellimitierung (Stickstoff und Phosphor) vor, was zu dem höheren Endlipidgehalt geführt haben könnte (Gill et al., 1977; Kolouchová et al., 2016).

Tabelle 7.3: Ergebnisse der Lipidproduktion mit *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor. ¹2,8 L-Maßstab, ²30 L-Maßstab.

Bedingung	Lipidgehalt, % (w/w)	Raum-Zeit- Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Lipidausbeute, g g^{-1}	Prozesszeit (Produktionszeit), d
N-Limitierung ¹	45	0,23	0,23	5,5 (4,6)
N-Limitierung ²	60	0,42	0,27	4,5 (3,8)
P-Limitierung ¹	70	0,53	0,26	5,7 (5,0)
P-Limitierung ²	83	0,51	0,27	4,6 (3,8)

7.3.3 Fettsäurezusammensetzung

Die Fettsäurezusammensetzung der gebildeten Lipide im 30 L-Maßstab sind in Tabelle 7.4 vergleichend mit dem 2,8 L-Maßstab dargestellt. Dabei ist gut zu erkennen, dass sich die Zusammensetzungen in den verschiedenen Maßstäben nicht unterscheiden. Zudem liegt das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren über 1, was heißt, dass mehr ungesättigte Fettsäuren gebildet werden. Auch zeigt sich das Sättigungsverhältnis sehr ähnlich zwischen den verschiedenen Maßstäben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der erhöhte Sauerstoffpartialdruck bei 2 bar im 30 L-Maßstab keinen Einfluss auf das Fettsäurespektrum hat. Umgekehrt lässt sich ebenfalls schlussfolgern, dass im 2,8 L-Maßstab bei atmosphärischem Druck keine Sauerstofflimitierung im Bypass auftrat.

Tabelle 7.4 zeigt allerdings auch, dass eine Änderung des Fettsäurespektrums bei veränderter Nährstofflimitierung beobachtet werden kann. So erhöht sich der Anteil der einfach ungesättigten Ölsäure (C18:1) von 40 % auf 56 % (w/w) sowie der ungesättigten Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) von 22 % auf 26 % (w/w). Gleichzeitig kann eine Abnahme der ungesättigten Fettsäure Stearinsäure (C18:0) und der zweifach ungesättigten Fettsäure

Linolsäure (C18:2) beobachtet werden. In der Summe bildet *T. oleaginosus* bei einer Phosphorlimitierung beziehungsweise bei einer Doppellimitierung (Stickstoff und Phosphor) mehr einfach ungesättigte Fettsäuren. Somit kann das Fettsäurespektrum in begrenzter Weise durch die Prozessbedingungen gesteuert werden.

Tabelle 7.4: Übersicht der Fettsäurezusammensetzung und des Verhältnisses zwischen gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren mit *T. oleaginosus* im Membranbioreaktor. ¹2,8 L-Maßstab, ²30 L-Maßstab.

Bedingung	Hauptsächlich vorkommende Fettsäuren, % (w/w)						Sättigungs- verhältnis
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
N-Limitierung ¹	0,3	21,5	21,7	43,0	13,1	0,4	1:1,3
N-Limitierung ²	0,3	21,7	24,5	40,3	12,8	0,4	1:1,2
P-Limitierung ¹	0,7	25,9	15,4	53,6	3,6	0,9	1:1,4
P-Limitierung ²	0,6	25,6	13,5	55,8	4,0	0,5	1:1,5

8 Zusammenfassung

Der bisherige Einsatz von oleogenen Hefen beschränkt sich meist auf die Nutzung von synthetischen Medien mit hohen Substratkonzentrationen zur Lipidproduktion unter aeroben Bedingungen. Für eine nachhaltige und wirtschaftliche Herstellung von mikrobiellen Ölen als Alternative zu anderen ölhaltigen Ausgangsstoffen, zum Beispiel als Vorläufer für die Biokraftstoffherstellung, müssen jedoch die Substratkosten gering gehalten werden. Daher ist die Entwicklung von Prozessen zur Lipidproduktion aus günstigen Abfallstoffen, wie beispielsweise pflanzliche Reststoffen, nötig. Bisher eingesetzte Abfallsubstrate zur Ölproduktion mit oleogenen Hefen wie deproteiniertes Molkenpermeat oder Melasse besitzen einen hohen Zuckergehalt (Cheirsilp und Louhasakul, 2013; Davies, 1988; Moon et al., 1978), während pflanzliche Reststoffe wie Mikroalgenrestbiomasse meist wenig biotechnologisch verwertbare Kohlenstoffquellen enthalten. Des Weiteren bildet Hydrolysat aus Mikroalgenrestbiomasse ein komplexes Zuckergemisch. Bisher wurde für oleogene Hefen kein Prozess zur Lipidproduktion mit komplexen Zuckergemischen oder mit niedrig konzentrierten Substraten beschrieben. Zudem bestand bisher keine Möglichkeit, Restalgenbiomasse, die noch große Mengen organischen Stickstoffs in Form von Protein- und Peptidresten sowie Phosphate enthält, für die Lipidproduktion mit oleogenen Hefen einzusetzen.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die reaktionstechnische Charakterisierung der beiden oleogenen Hefen *Trichosporon oleaginosus* und *Cryptococcus curvatus* hinsichtlich Wachstum und Lipidbildung unter Verwertung von einzelnen Monosacchariden sowie von Zuckergemischen in definierten Medium, da für diese Hefen in der Literatur ein breites Substratspektrum berichtet wurde (zum Beispiel Gujjari et al., 2011; Knoshaug et al., 2009). Als Beispiel für pflanzliche Reststoffe wurde ein Hydrolysat aus (entölter) Mikroalgenbiomasse als Satzmedium für die beiden Hefen angewandt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Erarbeitung eines kontinuierlichen Prozesses mit totaler Zellrückhaltung für eine Verweilzeitentkopplung von Medium und Zellen (Membranbioreaktor mit externem Membranmodul), um Untersuchungen zur Lipidherstellung von *T. oleaginosus* mit Fermentationsmedien mit niedrigem Zuckergehalt durchführen zu können. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend für eine Maßstabsvergrößerung in den 30 L-Maßstab genutzt. Abschließend sollten experimentelle Untersuchungen zur chemischen Phosphatfällung als Vorbehandlungsmethode von Algenhydrolysat für dessen Einsatz als Ölhefe-Fermentationsmedium durchgeführt werden, um die Lipidproduktion im Membranbioreaktor mit Algenhydrolysat zu ermöglichen.

In einem ersten Schritt konnte für *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 in kontrollierten Satzprozessen demonstriert werden, dass diese Hefe alle untersuchten Monosaccharide (Glucose, Mannose, Galactose, Rhamnose, Xylose, Arabinose) außer der Pentose Arabinose

verstoffwechseln und zum Wachstum nutzen kann. *T. oleaginosus* zeigte eine klare Präferenz für die Zucker Glucose und Xylose mit maximalen Substrataufnahmeraten von $\sim 0,60 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und maximalen Wachstumsraten von $0,17 - 0,24 \text{ h}^{-1}$. Mannose wurde ebenfalls von Beginn an durch die Zellen aufgenommen, während für Galactose und Rhamnose eine Verzögerungsphase von bis zu 4 h zu erkennen war. Beim Einsatz eines Zuckergemischs aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose beziehungsweise von Algenhydrolysat wurden alle vorhandenen Zucker simultan verstoffwechselt. Jedoch erfolgte die Aufnahme von Galactose deutlich verzögert, sobald Glucose und Mannose im Medium vorlagen. Es wurde eine maximale Wachstumsrate von bis zu $0,28 \text{ h}^{-1}$ mit dem Zuckergemisch als Substrat erzielt. In Satzversuchen mit Algenhydrolysat konnte für *T. oleaginosus* keine vermehrte Lipideinlagerung beobachtet werden.

Für einen Vergleich der Ergebnisse zur Zuckerverwertung und Lipidherstellung wurde die Hefe *Cryptococcus curvatus* CBS 5324 untersucht. Diese Hefe konnte alle sechs untersuchten Monosaccharide in kontrollierten Satzversuchen verstoffwechseln und zum Wachstum nutzen. Allerdings wurde die Pentose Arabinose nur sehr schlecht verwertet und die Hefe zeigte mit diesem Zucker eine um den Faktor 4 geringere maximale Wachstumsrate als zum Beispiel für Glucose ($\mu_{\max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$). Beim Einsatz eines Zuckergemischs aus 60 % (w/w) Glucose, 20 % (w/w) Mannose und 20 % (w/w) Galactose beziehungsweise von Algenhydrolysat wurden alle vorhandenen Zucker simultan verstoffwechselt und eine maximale Wachstumsrate von bis zu $0,20 \text{ h}^{-1}$ erzielt. In Satzversuchen mit Algenhydrolysat konnte für *C. curvatus* ebenfalls keine vermehrte Lipideinlagerung beobachtet werden. Außerdem lagen die ermittelten maximalen, spezifischen Wachstumsraten und Substrataufnahmeraten von *C. curvatus* meist um den Faktor 2 unter den Raten für *T. oleaginosus*. Für die Lipidbildung von *C. curvatus* in definiertem Medium konnte eine leichte Tendenz für pH 5,5 ermittelt werden. Im Millilitermaßstab wurden in Zulaufprozessen mit dem Zuckergemisch bis zu 25 % Lipide nach 96 h eingelagert. Mit Glucose als Substrat konnten in einem Zulaufprozess im Litermaßstab 59 % Lipide mit einer Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) von $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Lipidausbeute (Y_{LS}) von $0,18 \text{ g g}^{-1}$ in 150 h Prozesszeit produziert werden. Damit ist die Produktivität bis zu 60 % geringer als für andere in der Literatur beschriebene Prozesse (Li et al., 2007; Tai und Stephanopoulos, 2012).

Auch *T. oleaginosus* wies die höchste Lipidbildung bei einem pH von 5,5 auf. Während *C. curvatus* nur einen Lipidgehalt von 25 % unter stickstofflimitierenden Bedingungen in Zulaufprozessen mit dem Zuckergemisch nach 96 h Prozesszeit erzielte, konnte für *T. oleaginosus* bereits nach 72 h ein mehr als doppelt so hoher Lipidgehalt von 58 % gemessen werden. Dieser Wert ist vergleichbar mit Literaturangaben zu dieser Hefe mit Glucose oder Lactose als Substrate (53 - 57 %) (Hassan et al., 1996; Moon et al., 1978),

konnte aber im Vergleich zur Studie von Hassan et al. (1996) in weniger als der Hälfte der Zeit erzielt werden.

Neben der Induktion der Lipidbildung durch Stickstofflimitierung, deren Auswirkung auf die biochemische Vorgänge in oleogenen Hefezellen bereits aufgeklärt ist (Ratledge und Wynn, 2002), konnte die Lipidbildung auch durch Phosphorlimitierung ermöglicht werden. Dies wurde bisher nur für die Hefen *Rhodospordium toruloides* (Wu et al., 2010a) und *Candida* 107 (Gill et al., 1977) beschrieben. Eine erfolgreiche Lipidbildung gelang bei einem C/N-Verhältnis von 15 g g⁻¹ im Satzmedium (nach 72 h 57 ± 4 % Lipidgehalt) sowie bei einem C/P-Verhältnis von 3512 g g⁻¹ im Satzmedium (nach 102 h 39 ± 2 % Lipidgehalt) in Zulaufverfahren im Millilitermaßstab. Somit ist die Induktion mittels einer Phosphorlimitierung weniger effektiv als mittels einer Stickstofflimitierung. Während in der Literatur die Möglichkeit der Induktion der Lipidbildung durch eine Schwefellimitierung erfolgreich für *Rhodospordium toruloides* gezeigt wurde (Wu et al., 2011), konnte damit bei *T. oleaginosus* keine Lipidakkumulation induziert werden.

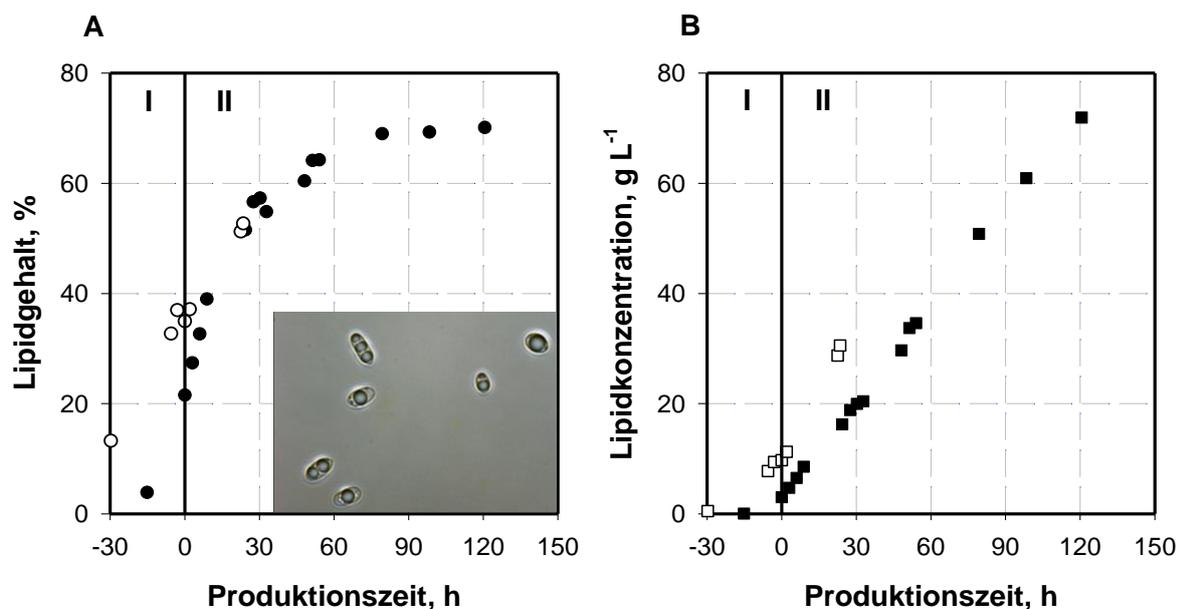


Abbildung 8.1: Verlauf der Lipidgehalte (A) und der Lipidkonzentrationen (B) bei kontinuierlichen Kultivierungen von *T. oleaginosus* mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor im Litermaßstab. Als Satz- und Zulaufmedium wurde entweder definiertes Medium mit einem C/P-Verhältnis von 3512 g g⁻¹ und 30 g L⁻¹ Glucose (●, ■) oder phosphatgefälltes Algenhydrolysat mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 40,6 g L⁻¹ und einem C/P-Verhältnis von 4826 g g⁻¹ (○, □) eingesetzt. Die Prozesse wurden bei 30 °C, 800 rpm, 2 L min⁻¹ Begasung mit steriler Luft über 93 h beziehungsweise 136 h durchgeführt. I Satzphase; II Produktionsphase mit D = 0,065 h⁻¹ und totaler Zellrückhaltung; Links sind zudem Zellen aus dem Prozess mit phosphatgefälltem Algenhydrolysat als Fermentationsmedium mit den eingelagerten Lipiden (*lipid bodies*) unter dem Lichtmikroskop (1000-fache Vergrößerung) gezeigt.

Um mit *T. oleaginosus* erfolgreich Lipide mit Algenhydrolysat als Substrat zu produzieren, wurden zwei Aspekte betrachtet: zuerst wurde eine chemische Phosphatfällung des Algenhydrolysats mit FeCl₃ durchgeführt. Hier wurde bis zu 99,85 % des vorhandenen Phosphats entfernt und somit ein phosphatlimitierendes Fermentationsmedium geschaffen. Anschließend wurde ein Membranbioreaktor mit einem externen Hohlfasermembranmodul zur

totalen Zellrückhaltung für die Lipidproduktion mit Medien mit niedrigem Zuckergehalt (wie Algenhydrolysat) etabliert. Durch die entstandene Verweilzeitentkopplung von Medium und Zellen konnte in definiertem Medium mit Stickstofflimitierung 45 % Lipide ($RZA = 0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $Y_{LS} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$), mit Phosphorlimitierung 70 % Lipide ($RZA = 0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $Y_{LS} = 0,26 \text{ g g}^{-1}$) und mit phosphatgefälltem Algenhydrolysat 53 % Lipide ($RZA = 0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $Y_{LS} = 0,43 \text{ g g}^{-1}$) produziert werden (siehe Abbildung 8.1). Die Lipidproduktion im Membranbioreaktor ist zwar hinsichtlich der Lipidgehalte und der Raum-Zeit-Ausbeuten meist niedriger als im Vergleich zu Zulaufkultivierungen mit Stickstofflimitierung und konzentrierter Glucoselösung über 72 h (68 % Lipidgehalt, $RZA = 0,44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $Y_{LS} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$), stellt aber eine einfache Prozessführung zur Lipidproduktion mit Fermentationsmedien dar, die nur niedrige Zuckerkonzentrationen enthalten. Die Maßstabsvergrößerung des Lipidproduktionsprozesses im Membranbioreaktor bis in den 30 L-Maßstab war erfolgreich.

9 Ausblick

Bei der Lipidbildung im Membranbioreaktor unter Phosphorlimitierung könnten zusätzlich niedrige Stickstoffkonzentrationen eine Rolle spielen. Die Erforschung von Mehrfachlimitierungen wäre ein lohnendes Ziel für weitere Arbeiten. Für die Kombination von Stickstofflimitierung mit Phosphor- oder Magnesiumlimitierung wurden in der Literatur bereits synergistische Effekte auf die Lipidakkumulation von oleogenen Hefen beschrieben (Bellou et al., 2016; Gill et al., 1977; Kolouchová et al., 2016).

Eine weitere Möglichkeit wäre es, eine Membranbioreaktorkaskade zur räumlichen Trennung von Wachstum und Produktbildung zu erarbeiten: im ersten Reaktor könnten unlimitierte Reaktionsbedingungen für exponentielles Wachstum der oleogenen Hefen vorliegen, während im zweiten Reaktor die Zellen in einem Schlüsselnährstoff limitiert sind und somit Lipide einlagern. Dabei dürften nicht alle Zellen vollständig zurück gehalten werden, sondern ein Teil der Zellen müsste von Membranbioreaktor 1 zu Membranbioreaktor 2 gelangen, was durch die Applikation eines *Bleed*-Stroms von Reaktor 1 zu Reaktor 2 realisiert werden könnte. Zusätzlich könnte ein *Bleed*-Strom aus Membranbioreaktor 2 zur kontinuierlichen Weiterverarbeitung der Zellen heraus führen.

Ein weiterer Schritt wäre auch die Anwendung des Membranbioreaktors für andere Biomassehydrolysate mit niedrigem Zuckergehalt oder bei Anwesenheit von Inhibitoren. Das Prinzip der kontinuierlichen Kultivierung mit totaler Zellrückhaltung durch ein Membranmodul könnte dabei beispielsweise auf andere pflanzliche Reststoffe und Abfallstoffe übertragen werden.

Literaturverzeichnis

- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G., 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1219–27. doi:10.1007/s00253-011-3200-z
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, M. De, Leonardi, A., Rossi, M., 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb. Cell Fact.* 9, 7–12.
- Antranikian, G., 2006. *Angewandte Mikrobiologie*, *Angewandte Mikrobiologie SE* - 28. doi:10.1007/3-540-29456-2
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I.-E., Mizerakis, P., Aggelis, G., 2016. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *J. Biotechnol.* 234, 116–126. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.08.001
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1193–206. doi:10.1007/s00253-011-3212-8
- Bernhauer, K., Niethammer, A., Rauch, J., 1948. Beiträge zur mikrobiologischen Eiweiß- und Fettsynthese I-III. *Biochem. Z* 319, 77–119.
- Bever, J., 1995. Grundlagen und Verfahren der chemisch-physikalischen P-Elimination, in: Bever, J., Stein, A., Teichmann, H. (Eds.), *Weitergehende Abwasserreinigung*. R. Oldenburg Verlag, München, pp. 279–300.
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E., 1983. CELL WALL COMPOSITION OF CHLOROCOCCAL ALGAE. *Phytochemistry* 22, 1603–1604.
- Botham, P.A., Ratledge, C., 1979. A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 114, 361–375.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 145, 79–99. doi:10.1016/0022-0981(91)90007-J
- Cantarella, M., Spera, A., Cantarella, L., Alfani, F., 1998. Acrylamide production in an ultrafiltration-membrane bioreactor using cells of *Brevibacterium imperialis* CBS 489-74. *J. Memb. Sci.* 147, 279–290. doi:10.1016/S0376-7388(98)00147-1
- Carstensen, F., Apel, A., Wessling, M., 2012. In situ product recovery: Submerged membranes vs. external loop membranes. *J. Memb. Sci.* 394-395, 1–36. doi:10.1016/j.memsci.2011.11.029
- Chang, H.N., Lee, W.G., Kim, B.S., 1993. Cell retention culture with an internal filter module: continuous ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 677–81.

doi:10.1002/bit.260410612

- Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., 2013. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresour. Technol.* 142, 329–37. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.012
- Chmiel, H., 2011. Bioprozesstechnik.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101, 5330–5336. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.026
- Christophe, G., Deo, J.L., Kumar, V., Nouaille, R., Fontanille, P., Larroche, C., 2012. Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1270–9. doi:10.1007/s12010-011-9507-5
- Daniel, S., Brauer, H., 1994. Continuous production of citric acid in the reciprocating-jet-bioreactor. *Bioprocess Eng.* 11, 123–127. doi:10.1007/BF00518733
- Davies, R.J., 1988. Yeast Oil from Cheese Whey - Process Development, in: Moreton, R.S. (Ed.), *Single Cell Oil*. Longman Scientific & Technical, Essex, England, pp. 99–146.
- Davies, R.J., Holdsworth, J.E., Reader, S.L., 1990. The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 569–573.
- Dong, H., Tang, Y.-J., Ohashi, R., Hamel, J.-F.P., 2008. A Perfusion Culture System Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor for Hyperproduction of IgG2a Monoclonal Antibody by Hybridoma Cells. *Biotechnol. Prog.* 21, 140–147. doi:10.1021/bp049826l
- Doran, P.M., 1997. *Bioprocess Engineering Principles* 919. doi:10.1016/S0892-6875(96)90075-8
- Duarte, N.C., Palsson, B.Ø., Fu, P., 2004. Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 5, 63. doi:10.1186/1471-2164-5-63
- Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* 100, 356–61. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.030
- Eisentraut, A., 2010. Sustainable Production of Second- generation Biofuels, International Energy Agency. doi:10.1787/9789264084247-en
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Madani, M., 2012. Bioconversion of different carbon sources into microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts. *J. Biol. today's world* 1, 82–92.

- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yáñez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O., 2009. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1275–1287. doi:10.1016/j.rser.2008.08.014
- Evans, C.T., Ratledge, C., 1984. Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1693–1704.
- Evans, C.T., Ratledge, C., 1983a. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18, 623–9.
- Evans, C.T., Ratledge, C., 1983b. Biochemical Activities During Lipid Accumulation in *Candida curvata*. *Lipids* 18, 630–635.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., 2008. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1062–1070. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03839.x
- Feldmann, H., 2010. *Yeast*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Freeman, A., Woodley, J.M., Lilly, M.D., 1993. In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Biotechnology*. (N. Y). 11, 1007–12.
- Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., Compagno, C., 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresour. Technol.* 111, 398–403. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.004
- Gill, C.O., Hall, M.J., Ratledge, C., 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 577–584.
- Gnirss, R., Lesjean, B., Buisson, H., Zuehlke, S., Duennbier, U., 2003. IMF – Membranbelebungsverfahren: Kosteneffektive Abwasserreinigung mit dem Membranbelebungsverfahren für dezentrale Standorte, in: KompetenzZentrum Wasser Berlin.
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2010. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids* 45, 1053–60. doi:10.1007/s11745-010-3468-2
- Gujjari, P., Suh, S.-O., Coumes, K., Zhou, J.J., 2011. Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov. *Mycologia* 103, 1110–8. doi:10.3852/10-403
- Hang, H., Bao, S., Zhao, M., Wang, B., Zhou, S., Jiang, B., 2015. Enzyme membrane reactor coupled with nanofiltration membrane process for difructose anhydride III from inulin

- conversion. Chem. Eng. J. 276, 75–82. doi:10.1016/j.cej.2015.04.018
- Harun, R., Danquah, M.K., 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. Chem. Eng. J. 168, 1079–1084. doi:10.1016/j.cej.2011.01.088
- Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.-M., Pareilleux, A., Goma, G., 1996. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. Process Biochem. 31, 355–361. doi:10.1016/0032-9592(95)00077-1
- Hassan, M., Blanc, P.J., Pareilleux, A., Goma, G., 1995. Production of cocoa butter equivalents from prickly-pear juice fermentation by an unsaturated fatty acid auxotroph of *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. Process Biochem. 30, 629–634. doi:10.1016/0032-9592(94)00061-1
- Heredia, L., Ratledge, C., 1988. Simultaneous utilization of glucose and xylose by *Candida curvata* D in continuous culture. Biotechnol. Lett. 10, 25–30.
- Höfel, T., 2011. Reaktionstechnische Analyse rekombinanter Mikroorganismen zur Herstellung von Hydroxyisobuttersäure. TU München.
- Holdsworth, J.E., Ratledge, C., 1988. Lipid Turnover in Oleaginous Yeasts. J. Gen. Microbiol. 134, 339–346. doi:10.1099/00221287-134-2-339
- Hortsch, R., 2011. Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. TU München.
- Hortsch, R., Weuster-Botz, D., 2010. Milliliter-Scale Stirred Tank Reactors for the Cultivation of Microorganisms, in: Laskin, A., Sariaslani, S., Gadd, G. (Eds.), Advances in Applied Microbiology. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 61–82. doi:10.1016/S0065-2164(10)73003-3
- Huang, C., Wu, H., Li, R., Zong, M., 2012. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. N. Biotechnol. 29, 372–8. doi:10.1016/j.nbt.2011.03.008
- Huang, C., Zong, M., Wu, H., Liu, Q., 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour. Technol. 100, 4535–8. doi:10.1016/j.biortech.2009.04.022
- Huerlimann, R., de Nys, R., Heimann, K., 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. Biotechnol. Bioeng. 107, 245–57. doi:10.1002/bit.22809
- Hufford, K., Hamel, J., Hufford, K., 2007. Comparison of the growth and monoclonal antibody production of suspended mammalian cells in three perfusion systems. Massachusetts Insitute of Technology.

- Jandel, A.-S., Hustedt, H., Wandrey, C., 1982. Continuous Production of L-Alanine from Fumarate in a Two-stage Membrane Reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15, 59–63.
- Judd, S., 2008. The status of membrane bioreactor technology. *Trends Biotechnol.* 26, 109–116. doi:10.1016/j.tibtech.2007.11.005
- Kantzow, C., Mayer, A., Weuster-Botz, D., 2015. Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *J. Biotechnol.* 212, 11–18. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.07.020
- Knoshaug, E.P., Franden, M.A., Stambuk, B.U., Zhang, M., Singh, A., 2009. Utilization and transport of l-arabinose by non-*Saccharomyces* yeasts. *Cellulose* 16, 729–741. doi:10.1007/s10570-009-9319-8
- Kolouchová, I., Mařátková, O., Sigler, K., Masák, J., Řezanka, T., 2016. Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol. (Praha)*. 1–8. doi:10.1007/s12223-016-0454-y
- Kourist, R., Bracharz, F., Lorenzen, J., Kracht, O.N., Chovatia, M., Daum, C., Deshpande, S., Lipzen, A., Nolan, M., Ohm, R.A., Grigoriev, I. V., Sun, S., Heitman, J., Brück, T., Nowrousian, M., 2015. Genomics and transcriptomics analyses of the oil-accumulating basidiomycete yeast *Trichosporon oleaginosus*: Insights into substrate utilization and alternative evolutionary trajectories of fungal mating systems. *MBio* 6, 1–13. doi:10.1128/mBio.00918-15
- Kurosawa, K., Boccazzi, P., de Almeida, N.M., Sinskey, A.J., 2010. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *J. Biotechnol.* 147, 212–8. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.04.003
- Leman, J., Bednarski, W., Tomasik, J., 1990. Influence of Cultivation Conditions on the Composition of Oil Produced by *Candida curvata* D. *Biol. Wastes* 31, 1–15.
- Li, M., Liu, G.-L., Chi, Z., Chi, Z.-M., 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy* 34, 101–107. doi:10.1016/j.biombioe.2009.10.005
- Li, Q., Du, W., Liu, D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 749–56. doi:10.1007/s00253-008-1625-9
- Li, Y., Zhao, Z. (Kent), Bai, F., 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 312–317. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
- Liew, M.K.H., Fane, A.G., Rogers, P.L., 1995. Applicability of continuous membrane bioreactor in production of phenylacetylcarbinol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 64, 200–206.

doi:10.1002/jctb.280640214

- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Zhao, Z.K., 2011. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *J. Biotechnol.* 152, 184–8. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.02.010
- Linko, V., Eerikäinen, M., Kostianen, M.A., 2015. A modular DNA origami-based enzyme cascade nanoreactor. *Chem. Commun.* 51, 5351–5354. doi:10.1039/C4CC08472A
- Liu, B., Zhao, Z.K., 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775–780. doi:10.1002/jctb
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631–45. doi:10.1007/s00253-012-4398-0
- Meesters, P. a. E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G., 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 575–579. doi:10.1007/s002530050731
- Melin, T., Rautenbach, R., 2013. *Membranverfahren-Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, Third Edit. ed, Journal of Chemical Information and Modeling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Melzoch, K., Rychtera, M., Markvichov, N.S., Pospíchalová, V., Basařová, G., Manakov, M.N., 1991. Application of a membrane recycle bioreactor for continuous ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 469–472. doi:10.1007/BF00180572
- Meng, F., Chae, S.R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Res.* 43, 1489–1512. doi:10.1016/j.watres.2008.12.044
- Monod, J., 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371–394. doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
- Moon, N.J., Hammond, E.G., Glatz, B. a., 1978. Conversion of Cheese Whey and Whey Permeate to Oil and Single-Cell Protein. *J. Dairy Sci.* 61, 1537–1547. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83762-X
- Moreton, R., Ratledge, C., Scragg, A., Leathers, R., Davies, R., Hammonnd, E., Glatz, B., 1988. *Moreton-Single Cell Oil*. Longman Scientific & Technical, Essex, England.
- Ohashi, R., Mochizuki, E., Kamoshita, Y., Suzuki, T., 1998. High-level expression of the methanol-inducible β -galactosidase gene by perfusion culture of recombinant *Pichia pastoris* using a shaken ceramic membrane flask. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 44–48.

doi:10.1016/S0922-338X(98)80032-9

- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1052–1073. doi:10.1002/ejlt.201100015
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* 82, 43–49.
- Park, B.G., Lee, W.G., Chang, Y.K., Chang, H.N., 1999. Long-term operation of continuous high cell density culture of *Saccharomyces cerevisiae* with membrane filtration and on-line cell concentration monitoring. *Bioprocess Eng.* 21, 97–100. doi:10.1007/PL00009070
- Park, W.-S., Murphy, P.A., Glatz, B.A., 1990. Lipid metabolism and cell composition of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown at different carbon to nitrogen ratios. *Can. J. Microbiol.* 36, 318–326.
- Pinnekamp, J., Friedrich, H., 2006. Membrantechnik für die Abwasserreinigung, Siedlungswasser- und Siedlungsabfallwirtschaft Nordrhein-Westfalen - Band 1.
- Ratledge, C., 2008. 4 Microbial Lipids, in: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology: Products of Secondary Metabolism*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 133–143. doi:10.1002/9783527620890.ch4
- Ratledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807–15. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.017
- Ratledge, C., 1982. Single Cell Oil. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 58–60.
- Ratledge, C., Cohen, Z., 2008. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* 20, 155–160. doi:10.1002/lite.200800044
- Ratledge, C., Wynn, J.P., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*
- Ratray, J.B., Schibeci, A., Kidby, D.K., 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39, 127–231.
- Richmond, A., Hu, Q., 2013. *Handbook of microalgal culture*, second ed. ed. Wiley Blackwell.
- Riedlberger, P., Brüning, S., Weuster-Botz, D., 2013. Characterization of stirrers for screening studies of enzymatic biomass hydrolyses on a milliliter scale. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 927–935. doi:10.1007/s00449-012-0826-x
- Ryu, B.-G., Kim, J., Kim, K., Choi, Y.-E., Han, J.-I., Yang, J.-W., 2012. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2012.09.054

- Sankh, S., Thiru, M., Saran, S., Rangaswamy, V., 2012. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel* 12–14. doi:10.1016/j.fuel.2012.12.014
- Santos, A., Ma, W., Judd, S.J., 2011. Membrane bioreactors: Two decades of research and implementation. *Desalination* 273, 148–154. doi:10.1016/j.desal.2010.07.063
- Schmieder, A., Severin, T.S., Cremer, J.H., Weuster-Botz, D., 2015. A novel milliliter-scale chemostat system for parallel cultivation of microorganisms in stirred-tank bioreactors. *J. Biotechnol.* 210, 19–24. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.402
- Schügerl, K., Bellgardt, K.-H., 1992. *Bioreaction Engineering, Chemical Engineering Science.* doi:10.1016/0009-2509(92)80051-D
- Seo, Y. hwan, Han, S., Han, J.I., 2014. Economic biodiesel production using algal residue as substrate of lipid producing yeast *Cryptococcus curvatus*. *Renew. Energy* 69, 473–478. doi:10.1016/j.renene.2014.03.062
- Seo, Y.H., Lee, I.G., Han, J.I., 2012. Cultivation and lipid production of yeast *Cryptococcus curvatus* using pretreated waste active sludge supernatant. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2012.10.024
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., Zhao, Z.K., 2013. Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *J. Biotechnol.* 1–5. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.08.010
- Sitanggang, A.B., Drews, A., Kraume, M., 2016. Development of a continuous membrane reactor process for enzyme-catalyzed lactulose synthesis. *Biochem. Eng. J.* 109, 65–80. doi:10.1016/j.bej.2016.01.006
- Sitepu, I.R., Ignatia, L., Franz, a K., Wong, D.M., Faulina, S. a, Tsui, M., Kanti, a, Boundy-Mills, K., 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J. Microbiol. Methods* 91, 321–8. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.001
- Sitepu, I.R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J.B., Gillies, L. a, Almada, L. a G., Boundy-Mills, K.L., 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresour. Technol.* 144, 360–9. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.047
- Tai, M., Stephanopoulos, G., 2012. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* 15, 1–9. doi:10.1016/j.ymben.2012.08.007
- Takakuwa, N., Saito, K., 2010. Conversion of beet molasses and cheese whey into fatty acid methyl esters by the yeast *Cryptococcus curvatus*. *J. Oleo Sci.* 59, 255–60.

- Templeton, D.W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D., Laurens, L.M.L., 2012. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *J. Chromatogr. A* 1270, 225–234. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.034
- Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V., 2011. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresour. Technol.* 102, 10436–40. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.102
- Turcotte, G., Kosaric, N., 1988. Biosynthesis of lipids by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *J. Biotechnol.* 8, 221–237. doi:10.1016/0168-1656(88)90004-1
- Von Stockar, U., Liu, J.S., 1999. Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1412, 191–211. doi:10.1016/S0005-2728(99)00065-1
- Weuster-Botz, D., 2005. Parallel reactor systems for bioprocess development. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 92, 125–143. doi:10.1007/b98916
- Weuster-Botz, D., 1999. Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung.
- Wiebe, M.G., Koivuranta, K., Penttilä, M., Ruohonen, L., 2012. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnol.* 12, 1–10.
- Wieczorek, S., Brauer, H., 1998. Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. *Bioprocess Eng.* 18, 75. doi:10.1007/s004490050414
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., Zhao, Z.K., 2010a. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* 101, 6124–6129. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.111
- Wu, S., Hu, C., Zhao, X., Zhao, Z.K., 2010b. Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 727–733. doi:10.1002/ejlt.201000005
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., Zhao, Z.K., 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 1803–1807. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.033
- Wynn, J.P., Ratledge, C., 2005. Oils from Microorganisms, in: Shahidi, F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons Inc., pp. 121–153.
- Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W., Tan, T., 2010. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresour. Technol.* 101, 6092–

5. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.124

- Yen, H.-W., Zhang, Z., 2011. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 71–4. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.03.013
- Ykema, a, Bakels, R.H., Verwoert, I.I., Smit, H., van Verseveld, H.W., 1989. Growth yield, maintenance requirements, and lipid formation in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1268–76. doi:10.1002/bit.260341005
- Ykema, a, Verbree, E.C., van Verseveld, H.W., Smit, H., 1986. Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 52, 491–506.
- Yousuf, A., 2012. Biodiesel from lignocellulosic biomass--prospects and challenges. *Waste Manag.* 32, 2061–7. doi:10.1016/j.wasman.2012.03.008
- Yu, X., Zeng, J., Zheng, Y., Chen, S., 2014a. Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochem.* 49, 457–465. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.016
- Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., Chen, S., 2014b. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biomass and Bioenergy* 71, 340–349. doi:10.1016/j.biombioe.2014.09.023
- Zhang, G., French, W.T., Hernandez, R., Alley, E., Paraschivescu, M., 2011. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy* 35, 734–740. doi:10.1016/j.biombioe.2010.10.009
- Zhang, J., Fang, X., Zhu, X.-L., Li, Y., Xu, H.-P., Zhao, B.-F., Chen, L., Zhang, X.-D., 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass and Bioenergy* 35, 1906–1911. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.024
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H., Zhao, Z.K., 2011. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 627–632. doi:10.1007/s10295-010-0808-4
- Zheng, Y., Chi, Z., Ahring, B.K., Chen, S., 2012. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: Ammonia's effect. *Biomass and Bioenergy* 37, 114–121. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.022

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ACL	ATP-Citrat-Lyase
AMP	Adenosinmonophosphat
C/N-Verhältnis	Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff, g g ⁻¹ beziehungsweise mol mol ⁻¹
C/P-Verhältnis	Verhältnis von Kohlenstoff zu Phosphor, g g ⁻¹ beziehungsweise mol mol ⁻¹
C/S-Verhältnis	Verhältnis von Kohlenstoff zu Schwefel, g g ⁻¹ beziehungsweise mol mol ⁻¹
CHO-Zellen	<i>Chinese-hamster-ovary</i> -Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	Gelöstsauerstoffkonzentration (<i>dissolved oxygen</i>)
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
FAMEs	Fettsäuremethylester (<i>fatty acid methyl esters</i>)
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
ID	Innendurchmesser
ISPR	<i>in situ</i> Abzug von Produkten (<i>in situ product removal</i>)
ME	Malatenzym
MES	2-N-Morpholino-Ethansulfonsäure-Puffer
MTP	Mikrotiterplatte
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaOAc	Natriumacetatpuffer
OD ₍₆₀₀₎	Optische Dichte (bei 600 nm)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PES	Polyethersulfon
PS	Polysulfon
PUFAs	mehrfachungesättigte Fettsäuren (<i>poly unsaturated fatty acids</i>)
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, g L ⁻¹ h ⁻¹
SCO	Mikrobielles Öl (<i>single cell oil</i>)
TAG	Triglycerid (<i>triacyl glyceride</i>)
TMP	Transmembrandruck (<i>trans membrane pressure</i>)
VE	voll entsalzt
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Dextrose (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

Symbol	Bezeichnung
$\mu_{(\max)}$	(maximale) spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
$C^*_{\text{O}_2}$	Sättigungskonzentration für Sauerstoff im Medium, g L^{-1}
CER	Kohlendioxidbildungsrate (<i>carbon dioxide evolution rate</i>), $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$C_{i(\text{ein/aus})}$	Konzentration der Komponente i (im Zulauf oder Ablauf), g L^{-1}
C_L	Lipidkonzentration, g L^{-1}
C_{NH_3}	Ammoniakkonzentration, g L^{-1}
C_{O_2}	Sauerstoffkonzentration im Medium, g L^{-1}
C_P	Produktkonzentration, g L^{-1}
C_S	Konzentration des Substrats S, g L^{-1}
C_X	Biomassekonzentration, g L^{-1}
C_{X+L}	Konzentration der lipidhaltigen Biomasse, g L^{-1}
D	Verdünnungsrate oder Durchflussrate (<i>dilution rate</i>), h^{-1}
F_B	<i>Bleed</i> -Volumenstrom, L h^{-1}
$F_{\text{ein}}, F_{\text{aus}}$	Zulauf beziehungsweise Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
$F_{\text{Gas,ein}}$	Zuluftstrom in den Reaktor, L h^{-1}
F_P	Permeatvolumenstrom, L h^{-1}
F_R	Retentatvolumenstrom, L h^{-1}
$k_{L,a}$	Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, s^{-1}
K_S	Affinitätskonstante für das Substrat S, g L^{-1}
m_L	Masse Lipide, g
m_S	Zellspezifische Substrataufnahmerate für Erhaltungsstoffwechsel, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
m_{X+L}	Lipidhaltige Biomasse, g
OTR	Sauerstoffeintragsrate (<i>oxygen transfer rate</i>), $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
OUR	Sauerstoffaufnahmerate (<i>oxygen uptake rate</i>), $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_L	Zellspezifische Lipidbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_{NH_3}	Zellspezifische Substrataufnahmerate für Ammoniak, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_P	Zellspezifische Produktbildungsrate für das Produkt P, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_S	Zellspezifische Substrataufnahmerate für das Substrat S, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,\mu}$	Zellspezifische Substrataufnahmerate für Zellwachstum, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Zellspezifische Substrataufnahmerate für Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
R	Rezirkulationsverhältnis, -
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
RQ	Respirationsquotient, -
r_X	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
t	Zeit, h

V	Reaktionsvolumen, L
V_M	Molvolumen idealer Gase, L mol ⁻¹
V_{Probe}	Probenvolumen der Zellsuspension, L
V_R	Reaktorvolumen, L
$y_{\text{CO}_2,\text{aus}}$	Stoffmengenanteil des Kohlendioxids in der Abluft, %
$y_{\text{CO}_2,\text{ein}}$	Stoffmengenanteil des Kohlendioxids in der Zuluft, %
Y_{LS}	Lipidausbeute, g g ⁻¹
Y_{LX}	Lipidgehalt, g g ⁻¹
$y_{\text{O}_2,\text{aus}}$	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs in der Abluft, %
$y_{\text{O}_2,\text{ein}}$	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs in der Zuluft, %
Y_{PS}	Produktausbeute, g g ⁻¹
Y_{XO_2}	Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff, g g ⁻¹
$Y_{\text{XS},\mu}$	Biomasseausbeute, g g ⁻¹
τ	Mittlere hydraulische Verweilzeit, h

Anhang

A.1 Stammlösungen

Zuckerstammlösungen

Alle Zuckerstammlösungen wurden mit einer Endkonzentration von 250 oder 500 g L⁻¹ hergestellt. Für die Herstellung des Zuckergemischs (60 % w/w Glucose, 20 % w/w Mannose, 20 % w/w Galactose) wurde die drei Monosaccharide entsprechend eingewogen und gemeinsam sterilisiert. Die Sterilisation erfolgte bei 121 °C für 20 min separat zu den anderen Medienbestandteilen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Kaliumdihydrogenphosphatstammlösung

250 g L⁻¹ KH₂PO₄ wurden in VE-Wasser gelöst, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Dikaliumsulfatstammlösung

100 g L⁻¹ K₂SO₄ wurden in VE-Wasser gelöst, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Ammoniumsulfatstammlösung

250 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ wurden in VE-Wasser gelöst, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Kaliumhydroxidstammlösung

Für die Herstellung der 1 M KOH-Stammlösung wurden 56,112 g L⁻¹ KOH-Plätzchen unter Rühren in einem Eisbad gelöst, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Herstellung der 5 M KOH-Stammlösung wurden 280,56 g L⁻¹ KOH-Plätzchen unter Rühren in einem Eisbad gelöst, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Antischaumlösung

Für die Herstellung der 10 %igen Antischaumlösung wurden 10 mL Antischaumkonzentrat mit 90 mL VE-Wasser gemischt, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Nile-Red-Assay

Zur Durchführung des *Nile-Red*-Assays wurde eine DMSO:PBS-Stammlösung im Volumenverhältnis 1:1 hergestellt und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Zusätzlich wurden zwei *Nile-Red*-Stammlösungen hergestellt. Für Stammlösung 1 wurden 0,1 mg *Nile*

Red mL⁻¹ in Aceton gelöst. Stammlösung 2 wurde frisch durch 1:2 Verdünnung von Stammlösung 1 mit Aceton hergestellt. Die Lagerung der *Nile-Red*-Stammlösungen erfolgte bei -20 °C.

Probenvorbereitung für GC-Analytik

Zur Probenvorbereitung der Reaktorproben für die GC-Analytik wurden verschiedene Stammlösungen benötigt. Die 5%ige HCl-Methanol-Stammlösung wurde durch Mischen von 5 mL HCl (37 %) mit 95 mL Methanol hergestellt. Durch Lösen von g in 100 mL Methanol wurde die 0,5 M Natriummethoxidstammlösung hergestellt. Beide Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert. Der Standard zur Bestimmung der Methylierungseffizienz (C12-TAG-Stammlösung) wurde mit einer Konzentration von 2 mg mL⁻¹ Glycerintridodecanoat in Toluol frisch hergestellt.

A.2 HPLC-System

Komponente	Typ/Version	Hersteller
Autosampler	HPLC Autosampler Plus	Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific
Manager	Smartline 5000	Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific
Pumpe	HPLC LC Pumpe Plus	Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific
RI-Detektor	RI Detektor Plus	Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific
Säulenofen	Jet Stream 5 – 85 °C	Knauer
Software	Agilent EZChrom Elite	Agilent
Trennsäule	Rezex RPM Monosaccharide Pb ²⁺ (8%), 300x7,8 mm	Phenomenex
Vorsäule	SecurtiyGuard Standard Carbo-Pb+2	Phenomenex

A.3 GC-System

Komponente	Typ/Version	Hersteller
Autosampler	AOC-20i/s	Shimadzu Deutschland GmbH
Injektor	SPL-2010 Plus	Shimadzu Deutschland GmbH

FID-Detektor	FID-2010 Plus	Shimadzu Deutschland GmbH
Säulenofen	GC-2010 Plus	Shimadzu Deutschland GmbH
Software	GCSolution Analysis	Shimadzu Deutschland GmbH
Trennsäule	Zebtron™ ZB-Wax (Länge 30 m, ID 0,32 mm, Schichtdicke 0,25 µm)	Phenomenex

A.4 Software und Computerprogramme

Komponente	Typ/Version	Hersteller
Graphiksoftware	Sigmaplot 12.3	Systat Software Inc.
Textverarbeitung	MS Office 2013	Microsoft

A.5 Algorithmen zur Prozesskontrolle in den Rührkesselreaktoren

Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration in Satz- und Zulaufprozessen im Labfors 3:

```
#0, initial_settings, 5
```

```
Stirrer.sp=800
```

```
Temp.sp=30
```

```
Flow.sp=2
```

```
pH.sp=6.5
```

```
Pumpe.sp=0
```

```
if(seq_time>1) {seq=1}
```

```
#1, Stirrer, 30
```

```
//Der pO2 wird oberhalb von 20 % gehalten
```

```
if (pO2.v<20) {Stirrer.sp=Stirrer.sp+50}
```

```
if (Stirrer.sp>996) {seq=2}
```

```
#2, Flow, 30
```

```
if (pO2.v<20) {Flow.sp=Flow.sp+1}
```

```
if (Flow.sp>6) {Flow.sp=6}
```

Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration und des Reaktorgewichts im Membranbioreaktor(Labfors 3):

```
#0, initial_settings, 5
```

```
Stirrer.sp=800
```

```
Temp.sp=30
```

```
Flow.sp=2
```

```
pH.sp=6.5
```

```
Pumpe-neu.sp=0
```

```
if (seq_time>1) {seq=1}
```

```
#1, Messung, 1 // Abweichung überprüfen
```

```
//Der pO2 wird oberhalb von 20 % gehalten
```

```
if (pO2.v<20) {Stirrer.sp=Stirrer.sp+10}
```

```
if (Stirrer.sp>996) {stirrer.sp=1000}
```

```
if (Weight.v >= 0.005 or Weight.v <= -0.001) {seq = 2} else {seq = 1}
```

```
#2, Warten, 1 //1 Minute warten
```

```
if (seq_time > time(00:01)) {seq = 3}
```

```
#3, Messung 2, 1 //zweite Überprüfung
```

```
if (Weight.v >= 0.005){seq = 5}
```

```
if (Weight.v <= -0.001){seq = 4}
```

```
if (Weight.v < 0.005 and Weight.v > -0.005) {seq = 1}
```

```
#4 Weniger, 1 //Ablauf verringern
```

```
Pumpe-neu.sp=0
```

```
if (Pumpe-neu.sp < 0.1) {Pumpe-neu.sp=0}
```

```
seq = 1
```

```
#5 Mehr, 1 // Ablauf erhöhen
```

```
Pumpe-neu.sp=Pumpe-neu.sp+Weight.v*50;
```

```
if (Pumpe-neu.sp>15) {Pumpe-neu.sp=15}
```

```
seq = 1;
```

Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Membranbioreaktor (LP75):

Controlleroutput, %	-100	-80	-60	-40	-20	0	20	40	60	80	100
Rührersollwert, %	40	40	44	48	52	56	60	64	68	72	72
Rührerdrehzahl, rpm	400	400	440	480	520	560	600	640	680	720	720

Regelung des Reaktorlevels über Medienpumpe und AF Levelsonde (LP75):

Step	Aktion	Operator	Parameter
#1	wait for Antischaum Messwert R1	>=	1
#2	set output Dosierung ControlMode R1		0
#3	wait for Antischaum Messwert R1	=	0
#4	set output Dosierung ControlMode R1		2
#5	set output Dosierung Sollwert R1		100
#6	jump to #1		

A.6 Geräte

Verwendeter Glasrührkesselreaktor Labfors 3 einschließlich Peripheriegeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Laborrührkesselreaktor mit Steuereinheit	Labfors 3, Glasgefäß mit Doppelmantel	Infors HT
Prozesssoftware	IrisNT Pro Balance Version 5	Infors HT
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K85/425	Mettler-Toledo GmbH
pO ₂ -Elektrode	InPro6800	Mettler-Toledo GmbH
Waage	QC35EDE-S	Sartorius AG
Zulufffilter	Midisart 2000 (0,2 µm)	Sartorius AG
Ablufffilter	Sartobran 300 (0,2 µm)	Sartorius AG
Peristaltische Zulaufpumpe	BVP Standard mit Pumpenkopf Masterflex Easy Load	Ismatec
Mehrkanal-Zulaufpumpe	Reglo Digital	Ismatec
Rezyklierungspumpe	BVP Standard mit Pumpenkopf Classic Serie Modell 380	Ismatec
Hohlfasermodule	UFP-750-E4A	GE Healthcare and Life Sciences
Abgasanalytik	Easy Line + Advance SCC-F	ABB Germany

Verwendeter Edelstahlrührkesselreaktor LP75 einschließlich Peripheriegeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Edelstahlrührkesselreaktor	LP75	Bioengineering AG
Steuereinheit	Modul-Schrank	Bioengineering AG
Prozesssoftware	BioSCADA Lab	Bioengineering AG
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/150	Mettler-Toledo
pO ₂ -Elektrode	InPro6800	Mettler-Toledo
Peristaltische Pumpen	Peripex W1+W2	Bioengineering AG
Rezyklierungspumpe	SartoJet	Sartorius AG
Filterkassette (0,1 m ²)	Hydrosart® 0,2 µm	Sartorius AG
Abgasanalytik	BCP-CO ₂ und BCP-O ₂	BlueSens gas sensor GmbH

Verwendetes Parallelrührkesselreaktorsystem bioREACTOR48

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorblock	bioREACTOR48	2mag AG
Rührersteuerung	-	2mag AG
Sensorriegel	MCR 8*2 v5	PreSens GmbH
Einwegbioreaktoren	Mini-Bioreaktoren HTBD (mit Strömungsbrecher + Spots)	PreSens GmbH
Laborroboter	Freedom Evo	Tecan Deutschland GmbH
MTP-Photometer	Infinite® M200 Pro	Tecan Deutschland GmbH
MTP-Waschstation	Columbus Pro	Tecan Deutschland GmbH
Gasmischstation	MX4/4	DASGIP GmbH
Wasserbad (Heizung)	Haake W 15	PSL Systemtechnik GmbH
Wasserbad (Kühlung)	Durchlaufkühler	Fryka-Kältetechnik GmbH
Zulufffilter	Midisart 2000 (0,2 µm)	Sartorius AG
Reinigungsmittel für Laborroboter	Daily System Clean	LVL Technologies GmbH
Software für Laborroboter	Gemini V4.2.17.304	Tecan Deutschland GmbH
Software für Prozesssteuerung	Fedbatch-XP 1.0.248	DASGIP GmbH
Software für MTP-Photometer	Magellan™ V6.6	Tecan Deutschland GmbH

Allgemeine Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Accu-Chek	3040542	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Analytische Waage	Explorer E121245 (0,1 mg – 210 g)	Ohaus, Gießen
Analytische Waage	Explorer E1N213 (5 g – 32 kg)	Ohaus, Gießen
Autoklav	5075 ELV	Systec GmbH, Wettenberg
Autoklav	Varioklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel

Einstrahlphotometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific, Schwerte
Eismaschine	AF80	Scotsman, Mailand (Italien)
Gefrierschrank	Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank	Ultra Low	SANYO Electric Co., München
Gefriertrockner	Alpha 1-2 LD	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Glyzerin-Manometer	MS 463 GLY CRE	Landefeld, Kassel
Inkubationsschrank	-	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors HT GmbH, Bottmingen
Inkubationsschüttler	innova 44	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubationsschüttler	WiseCube wis-20	witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Magnetrührer	Variomag 90750	2mag AG, München
Mikroplattenphotometer	Multiscan FC	Thermo Scientific, Schwerte
Mikroskop	Axiolab	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	Lab 850	Schott Instruments
Pipetten	Transferpette S 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 10 mL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Sterilbank	Variolab Mobilion W90	Waldner Electronics, Wangen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Rotixa 50 R S	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Mikro 20	Hettich, Tuttlingen

A.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
2,2-Dimethoxypropane	D136808	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	A347782 146	Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniumsulfat	1E004997	AppliChem GmbH, Darmstadt
Antifoam 204	A6426-1KG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calciumchlorid	K26899178112	Merck KGaA, Darmstadt
Calcium-D(+)-Pantothenat	3812.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cobaltchlorid-Hexahydrat	B678639 106	Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Biotin	3822.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D(+)-Galactose	4987.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D(+)-Glucose-Monohydrat	4957,5	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
D(+)-Mannose	A2187,0250	AppliChem GmbH, Darmstadt
D(+)-Xylose	W360600-1kg	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	A1372,9010	AppliChem GmbH, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	4720.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Druckluft	-	Hausleitung
Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	P742.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (99 %, vergällt)	-	CLN GmbH Chemikalien Laborbedarf, Niederhummer
Glycerin (>99,5 %)	3783.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyceryl-Tridodecanoate	T4891-100MG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	253-3	Deutsche Hefewerke GmbH
Kaliumchlorid	6781.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	3964.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	490165003	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumsulfat	CN79.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kupfersulfat-Pentahydrat	A265990 133	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L(+)-Arabinose	5118.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Rhamnose	W373011-1kg	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	T888.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mangansulfat-Monohydrat	F974741 111	Merck KGaA, Darmstadt
Marine Oil FAME Mix	35066	Restek GmbH, Anschaffenburg
MES-Monohydrat	6066.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	1060111000	Merck KGaA, Darmstadt
Methyl-Laurat	35043	Restek GmbH, Anschaffenburg
Myo-Inositol	D00034240	Calbiochem EMD Biosciences, Darmstadt
Natriummethoxid	164992.100g	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

n-Hexan (> 99 %)	CP47.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pepton aus Casein	8986.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pyridoxin-Hydrochlorid	T914.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	10314253	Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Schwefelsäure	X876.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Stickstoff	-	Air Liquide
Toluol	7346.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	TA754383 101	Merck KGaA, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Glaswaren	Schott, Mainz
Handschuhe Select Plus	Unigloves, Troisdorf
Handschuhe Soft Nitril Plus	Unigloves, Troisdorf
Küvetten Halbmikro	Ratiolab, Dreieich
Mikroeinsätze für Probengläschen (2 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mikrotiterplatten, schwarz	Greiner bio-one, Österreich
Mikrotiterplatten, transparent	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Pechinery, USA
Petrischalen	Greiner bio-one, Österreich
Pipettenspitzen (200 – 1000 µL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Probengläschen (10 mL)	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Probengläschen (2 mL)	Machery-Nagel, Düren
Pumpschläuche (Marprene)	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Pumpschläuche (PharMed)	Ismatec
Reaktionsgefäße (1 – 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 – 50 mL)	Greiner bio-one, Österreich
Silikonschläuche (div.)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spritzen (1 – 50 mL)	Becton-Dickinson SA, Fraga, Spanien