

Herstellung von D-Galacturonsäure aus Agrarreststoffen mit *Aspergillus niger* im Rührkesselreaktor

Dominik Sebastian Schäfer

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr. Ing.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Petra Mela

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. Johan Philipp Benz

Die Dissertation wurde am 23.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Engineering and Design am 04.10.2022 angenommen.

Für meine Eltern, Großeltern und Paula

*“The most important thing
is to try and inspire people
so that they can be great
in whatever they want to do”*

Kobe Bryant (* 23.08.1978 - † 26.01.2020)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. In dieser lehrreichen und intensiven Phase haben mich viele Menschen begleitet, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, den Freiraum bei der Bearbeitung meiner wissenschaftlichen Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Sie hatten stets ein offenes Ohr für alle wissenschaftlichen und akuten Fragestellungen ihrer Mitarbeiter. Sehr herzlichen Dank dafür. Außerdem möchte ich mich für den sehr verständnisvollen Umgang mit jeglichen Herausforderungen während der Abfassung meiner Arbeit sehr herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Philipp Benz möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats meiner Dissertation bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Petra Mela für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein sehr herzlicher Dank gilt auch meinen Projektpartnern der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft der Technischen Universität München Prof. Dr. Philipp Benz und Kevin Schmitz. Vielen Dank Philipp und Kevin für die Projektkoordination, den sehr anregenden Austausch, die stets hervorragende Zusammenarbeit und die ausgezeichnete Kommunikation.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung möchte ich mich für die Förderung des Projekts bedanken. Für die beratende Tätigkeit und die Bereitstellung der Zuckerrübenpressschnitzel bedanke ich mich bei Herrn Dr. Wolfgang Wach und der Südzucker AG.

Ein sehr besonderer Dank gebührt Jacqueline. Mit deiner positiven und optimistischen Art warst du stets eine große Stütze. Vielen Dank für die hervorragende Zusammenarbeit und deine unermüdliche Unterstützung.

Ich bedanke mich außerdem bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für den guten Zusammenhalt. Besonders möchte ich mich bei Peter, Christian, Christoph, Sabine, Johannes, Ljubomir, Lara, Karl, Ingmar, Anton, Kristin und Dat bedanken. Danke, dass aus Kollegen Freunde wurden.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Studierenden Theresa, Felix, Lucia, Atessa, João, Hannah, Simon, Melanie und Nathalie herzlichst bedanken. Ihr habt mit eurem Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die organisatorische und technische Hilfe aber vor allem für die Freundschaft über den Lehrstuhl hinaus möchte ich mich bei Markus, Patrick und Norbert bedanken.

Meiner Familie, meiner Frau Paula und meinen Freunden danke ich ganz besonders für die gemeinsame Zeit abseits der Arbeit. Ich danke euch für eure Unterstützung, eure verständnisvolle Art und euren unerschütterlichen Glauben in mich und das Gelingen der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Problemstellung und Zielsetzung.....	2
3.	Theoretische Grundlagen.....	7
3.1	Biologische Grundlagen <i>Aspergillus niger</i>	7
3.1.1	<i>Aspergillus niger</i>	7
3.1.2	Wachstum und Morphologie filamentöser Pilze.....	9
3.1.3	Regulation der Genexpression pektinolytischer Enzyme.....	15
3.2	Bioprozesstechnik.....	16
3.2.1	Kultivierung und Wachstumskinetik im Rührkesselreaktor.....	16
3.2.2	Betriebsweisen von Rührkesselreaktoren.....	18
3.2.3	Massentransport (Sauerstofftransport) im Rührkesselreaktor.....	20
3.2.4	Rheologie.....	23
3.3	Pektinreiche Agrarreststoffe.....	24
3.3.1	Zuckerherstellung aus der Zuckerrübe.....	24
3.3.2	Zuckerrübenschnitzel in der Bioökonomie.....	25
3.3.3	Zellwandpolysaccharide der Zuckerrübe.....	29
3.3.4	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln.....	34
4.	Material und Methoden.....	40
4.1	Mikroorganismus.....	40
4.2	Reaktionsmedien, Substrate und Puffer.....	42
4.2.1	Vorkulturmedium.....	42
4.2.2	Spurenelementlösung.....	43
4.2.3	Sporenlösung (NaCl-Tween).....	43
4.2.4	Analysepuffer (Natriumcitrat-Puffer).....	44
4.2.5	Zuckerrübenpressschnitzel (pektinreiche Reststoffe).....	44
4.2.6	Medium zur Kultivierung von <i>A. niger</i> im Rührkesselreaktor.....	45
4.2.7	Medium zur Hydrolyse pektinreicher Reststoffe.....	48
4.3	Kultivierung von <i>A. niger</i>	50

4.3.1	Stammhaltung.....	50
4.3.2	Vorkulturherstellung.....	50
4.3.3	Kultivierung im Schüttelkolben	51
4.3.4	Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab	51
4.3.5	Untersuchung von Rührerkonfigurationen im Rührkesselreaktor	56
4.4	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübensuspensionen	57
4.4.1	Enzymatische Hydrolyse im Milliliter-Maßstab	57
4.4.2	Enzymatische Hydrolyse im Liter-Maßstab	59
4.5	Analytische Methoden	61
4.5.1	Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse	61
4.5.2	Morphologische Charakterisierung.....	61
4.5.3	Quantifizierung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand.....	61
4.5.4	Quantifizierung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand.....	62
4.5.5	Viskositätsbasierte Bestimmung der Pektinase-Aktivität	64
4.5.6	Quantifizierung der Zuckerkonzentration im Kulturüberstand	64
4.5.7	Quantifizierung der Zuckerszusammensetzung pektinreicher Reststoffe	65
5.	Ergebnisse und Diskussion	67
5.1	Polygalacturonaseproduktion mit <i>A. niger</i> im Satzverfahren mit definiertem Medium	67
5.1.1	Polygalacturonaseproduktion verschiedener <i>A. niger</i> Stämme	67
5.1.2	Variation Leistungseintrag bei der Polygalacturonaseproduktion	74
5.2	Polygalacturonaseproduktion mit <i>A. niger</i> ATCC 11414 und Zuckerrübenschnitzeln.....	78
5.2.1	Variation der eingesetzten Substratkonzentration.....	78
5.2.2	Variation des pH	85
5.2.3	Variation der Stickstoffquelle	91
5.2.4	Variation der Inokulationskonzentration	97
5.3	Charakterisierung rekombinanter <i>A. niger</i> Stämme zur Polygalacturonaseherstellung.	102
5.3.1	Genetische Vorbereitung des Basisstammes <i>A. niger</i> ATCC 11414	102
5.3.2	Charakterisierung rekombinanter <i>A. niger</i> Stämme	106
5.4	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln	116

5.4.1	Zusammensetzungsanalyse der Zuckerrübenschnitzel.....	116
5.4.2	Untersuchung zur Inhibierung der hergestellten Enzymmischung	119
5.4.3	Enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im mL-Maßstab	121
5.4.4	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im Rührkesselreaktor	128
5.4.5	Diskussion	130
5.5	Gekoppelte Polygalacturonaseproduktion und enzymatische Hydrolyse	133
5.5.1	Voruntersuchungen	133
5.5.2	Prozessintegration	137
6.	Zusammenfassung und Ausblick	142
7.	Literatur	149
8.	Abkürzungen	165
9.	Anhang	166
9.1	Geräte, Chemikalien und Verbrauchmaterial	166
9.2	Tabellen und Abbildungen.....	174

1. Einleitung

Biotechnologische Verfahren finden bereits seit Jahrtausenden Anwendung in der Herstellung von Nahrungsmitteln und Biomolekülen für den menschlichen Bedarf. Die anfänglich unbewusste Nutzung mikrobieller Stoffumwandlungen hat sich innerhalb der letzten 100 Jahre zu einer Multimilliarden Euro schweren Industrie entwickelt, die eine ernsthafte Alternative zur Nutzung fossiler Rohstoffe darstellt (Cairns et al. 2018; Renneberg et al. 2012).

Mit dem global steigenden Bewusstsein für Nachhaltigkeit und Umweltschutz steigt auch der Bedarf an umweltfreundlichen, grünen Technologien, welche auf der stofflichen Umwandlung von regenerativen, pflanzlichen Ressourcen und deren ungenutzten Reststoffströmen basiert (Choi et al. 2015). Da ihre Nutzung eine große Herausforderung darstellt, werden Reststoffe aus der Nahrungsmittelindustrie jedoch bisher größtenteils als Futtermittel eingesetzt oder thermisch verwertet (Berlowska et al. 2015). Dabei enthalten genau diese Reststoffe meist noch wertvolle Biomoleküle, deren biotechnologische Verwertung die Wertschöpfung und Nachhaltigkeit etablierter Prozesse erheblich steigern kann (Bonnin et al. 2009).

Ein Musterbeispiel hierfür ist die Gewinnung von Saccharose aus Zuckerrüben. Im Produktionsjahr 2019/2020 fielen allein in Deutschland circa 2,9 Mio. Tonnen Zuckerrübenschnitzel (*engl. sugar beet pulp*) als Reststoff bei der Prozessierung von Zuckerrüben an (WVZ e.V. & VdZ e.V. 2021). Diese enthalten die pflanzlichen Zuckerpolymere Pektin, Cellulose und Hemicellulose. Vor allem das sehr heterogen zusammengesetzte Pektin und dessen Hauptmonomer D-Galacturonsäure sind von besonderem Interesse als Substrate für die mikrobielle Produktion von diversen Wertstoffen (Bonnin et al. 2009; Schmitz et al. 2019).

Um diese komplexen Agrarreststoffen wertschöpfend zu nutzen, bedarf es einer Vielzahl an enzymatisch katalysierten Reaktionen, welche die wertvollen Zuckermonomere freisetzen. Die hierfür benötigten Enzyme werden für gewöhnlich mittels hocheffizienter Mikroorganismen in biotechnologischen Verfahren hergestellt. Pilzlichen Produktionssystemen kommt dabei aufgrund ihrer Robustheit, den niedrigen Kultivierungsanforderungen und der Befähigung hohe Mengen Protein zu sekretieren eine entscheidende Rolle zu (Mäkelä et al. 2018; Meyer et al. 2011). Ein sehr bekannter Vertreter dieser Gruppe ist der Pilz *Aspergillus niger*, der aufgrund seiner langen Historie in der Biotechnologie gut erforscht und in der industriellen Produktion etabliert ist.

Mit den in hohen Mengen anfallenden Agrarreststoffen, dem mit rund 4,7 Milliarden Euro dotierten Markt für Enzyme und seiner antizipierten Verdopplung innerhalb der nächsten zehn Jahre, verspricht die mikrobielle Stoffumwandlung von Agrarreststoffen zu höherwertigen Produkten ein hohes Zukunftspotenzial (Meyer et al. 2016).

2. Problemstellung und Zielsetzung

Eine der größten globalen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts ist die Umstellung der auf fossilen Rohstoffen basierenden Linearwirtschaft zu einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft, die auf erneuerbaren biologischen Ressourcen im Sinne einer Bioökonomie aufbaut. Per Definition der deutschen Bundesregierung umfasst die Bioökonomie die Erzeugung, Erschließung und Nutzung biologischer Ressourcen, Prozesse und Systeme, um Produkte, Verfahren und Dienstleistungen in allen wirtschaftlichen Sektoren im Rahmen eines zukunftsfähigen Wirtschaftssystems bereitzustellen (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2021). Zur Realisierung werden Konzepte benötigt, die es neben der Nahrungsmittelsicherheit ermöglichen, erneuerbare Ressourcen für die stofflich-industrielle und energetische Nutzung verwenden zu können. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei in der Nutzung der Abfallströme, um so einen ökologischen Mehrwert zu generieren und die Nachhaltigkeit etablierter Prozesse erheblich zu steigern (Bonnin et al. 2009).

Insbesondere bei der Prozessierung landwirtschaftlicher Güter fallen eine Vielzahl unterschiedlicher Agrarreststoffe an, die sich aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften exzellent zur weiteren Wertschöpfung im Sinne des bioökonomischen Konzepts eignen. Ihre Nutzung stellt jedoch bisher eine große verfahrenstechnische Herausforderung dar, weswegen sie meist als Futtermittel verwendet, thermisch verwertet oder in Deponien endgelagert werden (Berlowska et al. 2015; Ptak et al. 2022).

So entsteht beispielsweise bei der konventionellen Herstellung von Saccharose (weißer Haushaltszucker) mit Zuckerrübenpressschnitzeln ein Agrarreststoff, der aufgrund seiner Eigenschaften als Ausgangsstoff für diverse stoffliche Umwandlungen dienen kann (Ptak et al. 2022). Insgesamt wurden im Jahr 2019/2020 zur ausreichenden Versorgung des Weltmarktes etwa 180 Mio. t Zucker erzeugt (24,2 % davon aus Zuckerrüben). Bezogen auf Deutschland lag der Produktionsumfang in besagtem Jahr bei 4,3 Mio. t Zucker. Bei der Prozessierung der dafür nötigen 27 Mio. t Zuckerrüben, wurden rund 1,5 Mio. t Zuckerrübenpressschnitzel als Reststoff generiert (WVZ e.V. & VdZ e.V. 2021). Zuckerrübenpressschnitzel bieten als Substrat ein hohes Potential, da sie am Ort ihrer Prozessierung zentral gesammelt werden, durch die vorherige Zuckerextraktion thermisch vorbehandelt sind und aufgrund ihres hohen Anteils an Polysacchariden (bis zu 80 %) bei niedrigem Ligningehalt bestens für eine weitere biotechnologische Verwertung geeignet sind. Aus diesen Gründen gelten sie als vielversprechendes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Plattformchemikalien als Synthesebausteine für Biokraftstoffe, die menschliche Ernährung, Kunststoffe, Kosmetika und pharmazeutisch aktive Substanzen (Finkenstadt 2014).

Im Allgemeinen bestehen Zuckerrübenpressschnitzel aus jeweils annähernd einem Drittel Cellulose, Hemicellulose und Pektin (Berlowska et al. 2018a). Von besonderem Interesse ist dabei der hohe Pektingehalt (24 % bis 32 %), da dessen Hauptmonomer, die D-Galacturonsäure durch gezielte enzymkatalysierte Reduktion zur Herstellung vielseitig einsetzbarer Polyhydroxysäuren verwendet werden kann (Wiebe et al. 2010). Diese Polyhydroxysäuren ähneln in ihrer Struktur konventionell hergestellten Säuerungsmitteln, Stabilisatoren und Backtriebmitteln der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie.

Für die Depolymerisation der Zuckerrübenpressschnitzel wird die enzymatische Hydrolyse gegenüber der chemischen Hydrolyse mit Säuren bevorzugt, da sie spezifischer, weniger aggressiv, nebenproduktärmer und energiesparsamer durchgeführt werden kann (Kühnel et al. 2011; Spagnuolo et al. 1997). Aufgrund der hohen Komplexität der in Zuckerrübenpressschnitzel enthaltenen Zuckerpolymere, benötigt man für eine effektive Hydrolyse eine Vielzahl an verschiedenen Enzymaktivitäten, die speziell für die Verflüssigung von Biomasse optimiert sind.

Problematisch hierbei ist, dass die überwiegende Mehrheit der kommerziell verfügbaren pektinolytisch wirkenden Enzympräparate für den Einsatz in der Lebensmittel- und Textilindustrie angepasst sind (Garg et al. 2016). In der Lebensmittelindustrie kommen sie vor allem in der Saft- und Weinherstellung zur Viskositätsreduktion, Klärung und Ausbeutesteigerung zum Einsatz. Im Gegensatz dazu kommen bei der Behandlung und Reinigung von Textilien ganz spezielle pektinolytische Enzyme zum Einsatz, die ihr Aktivitätsoptimum unter alkalischen Bedingungen zeigen (Garg et al. 2016). Zahlreiche dieser kommerziellen Enzympräparate werden mit filamentösen Pilzen hergestellt, da diese auf die Produktion hocheffizienter Enzymgemische spezialisiert sind (Benoit et al. 2012; Semenova et al. 2019). Daraus ergibt sich zusätzlich zum sich stark unterscheidenden Einsatzgebiet das weitere Problem, dass genaue Informationen zu den eingesetzten Produktionsstämmen, als Teil eines geschützten Unternehmens Know-hows, nicht zugänglich sind.

Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus niger* stellt dabei einen der besten bisher bekannten Produzenten pektinolytischer Enzyme dar (Benoit et al. 2012; Panda et al. 1999). Aufgrund seiner hohen sekretorischen Kapazität und der Einstufung als sicherer Organismus (GRAS) kann er als idealer Mikroorganismus für die Produktion von Enzymen angesehen werden (Benoit et al. 2012; El Enshasy et al. 2018).

Daher ist das erste Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung verschiedener *Aspergillus niger* Stämme hinsichtlich ihrer produzierten pektinolytischen Enzymaktivität zum anschließenden Einsatz in der Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln. Dazu wird sinnvollerweise zu Beginn der reaktionstechnischen Charakterisierung ein skalierbares Satzverfahren im L-Maßstab

als Basis zur Untersuchung der Produktion pektinolytischer Enzyme während der Submerskultivierung etabliert. Basierend auf diesem Satzverfahren kann anschließend die pektinolytische Aktivität verschiedener *A. niger* Stämme unter definierten Bedingungen im Rührkessel vergleichend charakterisiert werden. Nach Auswahl eines besonders geeigneten *A. niger* Stammes, basierend auf seiner pektinolytischen Aktivität, kann der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Produktion pektinolytischer Enzyme untersucht werden.

Fortschritte auf dem Gebiet der Metabolomik, Proteomik und Genomik sowie methodische Fortschritte auf dem Gebiet der Gentechnik konnten zeigen, welche genetischen Charakteristika wichtig für einen effizienten Abbau pflanzlicher Biomasse sind (Martens-Uzunova & Schaap 2009). Mit dem Verständnis der zugrundeliegenden regulatorischen Netzwerke und der Technologie diese beeinflussen zu können, werden in einer parallelen Forschungsarbeit durch den Projektpartner an der TU München (Prof. Dr. J. Philipp Benz, Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft) rekombinante *A. niger* Stämme erzeugt, die dann ebenfalls im Kontext der Herstellung pektinolytischer Enzyme unter den zuvor etablierten Reaktionsbedingungen vergleichend charakterisiert werden können.

Die angestrebte Totalhydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln ist aufgrund der komplexen Polymerstruktur und der daraus resultierenden Vielzahl an verschiedenen glycosidischen Bindungen und der Acetylierung und Methylierung der Zuckermonomere keine triviale Aufgabe. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Vielzahl an verschiedenen Enzymen notwendig ist, um diese anspruchsvolle Aufgabe durchzuführen (Glass et al. 2013; Semenova et al. 2019). Zusätzlich werden zur vollständigen Hydrolyse thermische und chemische Vorbehandlungen angewendet. Bei diesen Vorbehandlungen kommt es jedoch auch zur Zerstörung der labileren mono- und polymeren Bestandteile, sodass Abbauprodukte entstehen und damit verbunden ein Ausbeuteverlust auftritt (Bellido et al. 2015; Kühnel et al. 2011). Die enzymatische Aktivität und damit auch die Hydrolyseeffizienz ist dabei immer von den verwendeten Reaktionsbedingungen abhängig, weswegen diese und deren Einfluss unter Verwendung der mit *A. niger* hergestellten Enzymmischung zu untersuchen sind. Das Ziel der Untersuchungen zur Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln ist die Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen, durch welche eine möglichst vollständige Freisetzung von D-Galacturonsäure mit der hergestellten, zellfreien *A. niger* Enzymmischung in möglichst kurzer Prozesszeit erreicht werden kann.

Zur Bewertung der Hydrolyseeffizienz ist die Bestimmung der Ausbeute der freigesetzten Zucker besonders wichtig. Dazu ist die Kenntnis der genauen Zusammensetzung der eingesetzten Zuckerrübenpressschnitzel unabdingbar, weswegen zuallererst eine Zusammensetzungsanalyse des Substrats notwendig ist. Da das bei der Hydrolyse entstehende Zuckergemisch durchaus inhibitorische Effekte auf die eingesetzten Enzyme haben kann, welche für die

freigesetzte D-Galacturonsäurekonzentration beschrieben ist (Baciu & Jördening 2004; Bélafi-Bakó et al. 2007), ist außerdem eine Untersuchung der Inhibition der hergestellten Enzymmischung durch die freigesetzten Zuckermonomere sinnvoll.

Im Allgemeinen sind zur Freisetzung von Zielmolekülen aus Agrarreststoffen mit der Herstellung der hydrolytischen Enzyme und der enzymatischen Hydrolyse zwei getrennte Verfahrensschritte notwendig. Nach der Enzymherstellung kann mitunter auch eine Konzentrierung und Stabilisierung des Enzymgemischs sinnvoll sein, die somit weitere potenzielle Verfahrensschritte darstellen. Alternativ wird vermehrt an Verfahrensansätzen geforscht, welche unter dem Begriff „simultaneous saccharification and fermentation“, kurz: „SSF“ beschrieben sind, bei denen beide Prozessschritte vereint werden können. Bei diesen liegt das zu hydrolysierende Substrat zu Prozessbeginn im Medium vor, sodass der eingesetzte Mikroorganismus die freigesetzten Zucker verstoffwechseln oder zu dem gewünschten Produkt umsetzen kann (Devos & Colla 2022). Anwendung findet diese Verfahrensvariante vornehmlich bei der Herstellung von Bioethanol aus lignocellulosehaltigen Agrarreststoffen (Ask et al. 2012; Olofsson et al. 2008; Sasaki et al. 2014). Vorteile dieses Verfahrens sind niedrigere Investitionskosten aufgrund eingesparter Prozessschritte, kürzere Gesamtprozesszeiten und eine niedrigere Enzyminhibition aufgrund der direkten Verstoffwechslung der potenziell inhibierend wirkenden, freigesetzten Zucker durch den Produktionsorganismus.

Es gibt durchaus auch Untersuchungen bei denen Zuckerrübenpressschnitzel als Substrat in einem SSF-Prozess verwendet wurden (Berlowska et al. 2018b). Da *A. niger* jedoch befähigt ist, das gewünschte Zielmolekül D-Galacturonsäure zu verstoffwechseln muss entweder eine genetische Modifikation im D-Galacturonsäurestoffwechsel durchgeführt oder ein prozesstechnischer Ansatz gewählt werden, um von den Vorteilen einer solchen Prozessintegration profitieren zu können. Aus den genannten Gründen wird eine Prozessintegration der Enzymherstellung mittels *A. niger* und Hydrolyse des Agrarreststoffs Zuckerrübenpressschnitzel angestrebt, sodass beide Reaktionen in einem Rührkesselreaktor durchgeführt werden können, um dadurch die Raum-Zeit-Ausbeute entscheidend zu verbessern. Final soll mit dieser Prozessintegration ein verfahrenstechnisch und ökonomisch besonders geeigneter Prozess zur Herstellung von D-Galacturonsäure aus Zuckerrübenpressschnitzeln zur Verfügung stehen, der die effiziente Nutzung des Agrarreststoffs ermöglicht.

Die Realisierung der gesetzten Ziele wurde mit folgenden Arbeitsschritten angestrebt:

- a) Reaktionstechnische Charakterisierung von *Aspergillus niger* Stämmen zur Produktion pektinolytischer Enzyme
 - a. Etablierung eines skalierbaren Satzverfahrens im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab
 - b. Auswahl eines geeigneten Basisstamms unter definierten Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor
 - c. Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen zur Produktion pektinolytischer Enzyme
 - d. Reaktionstechnische Charakterisierung rekombinanter *A. niger* Stämme
- b) Untersuchungen zur Hydrolyse des Agrarreststoffs Zuckerrübenpressschnitzel
 - a. Zusammensetzungsanalyse der verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel
 - b. Inhibierungsuntersuchung der hergestellten Enzyme durch die freigesetzten Zuckermonomere
 - c. Identifikation geeigneter Bedingungen für die Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln mit pektinolytischen Enzymen von *A. niger*
- c) Prozessintegration der Enzymherstellung mit *A. niger* und Hydrolyse des pektinreichen Agrarrestoffs Zuckerrübenpressschnitzel in einem Rührkesselreaktor

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen *Aspergillus niger*

3.1.1 *Aspergillus niger*

Der ubiquitär vorkommende, filamentöse Bodenpilz *Aspergillus niger* stellt einen der Eckpfeiler der traditionellen, aber auch modernen Biotechnologie dar (Schuster et al. 2002). Diese Pilzart gehört im Phylum der *Ascomycota* (Schlauchpilze) zur Klasse der *Eurotiomycetidae*, und darin der Gattung *Aspergillus* an (Ordnung: *Eurotiales*, Familie: *Trichocomaceae*) (Scazzocchio 2019). Entdeckt wurde er 1729 durch den italienischen Botaniker Pietro Antonio Micheli. Der Name des Pilzes entstammt der Ähnlichkeit des morphologischen Erscheinungsbildes zu dem im christlichen Glauben verwendeten Weihwassersprenger (lat. *aspergillum*) (Scazzocchio 2019). Das zweite namensgebende Merkmal ist die schwarze (lat. *niger*) Pigmentierung der Konidiosporen (Abb. 3.1.1) (Kück et al. 2009).

Ascomyceten sind zur sexuellen und asexuellen Reproduktion befähigt. Bei der sexuellen Reproduktion werden die Sporen im sack- oder schlauchförmigen Ascus produziert. Viele Vertreter der Gattung können sich jedoch nur asexuell über die Bildung sogenannter Konidiosporen fortpflanzen. Dabei handelt es sich um einkernige, runde Sporen mit einem Durchmesser von 4-5 μm , die sich an den Lufthyphen über die Ausbildung von Konidiophoren entwickeln (Fuchs 2007; Kück et al. 2009). *Aspergillus niger* ist selbst nur zur asexuellen Reproduktion befähigt, weshalb er in das mittlerweile veraltete Form-Taxon der Deuteromyceten oder *fungi imperfecti* eingeordnet wurde (Scazzocchio 2019). Die gebildeten Sporen dienen der Ausbreitung und Arterhaltung und werden überwiegend über die Luft verbreitet. Zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit sind die Sporen durch Melanine dunkel pigmentiert, die als Schutz vor dem UV-Anteil der Sonnenstrahlung fungieren (Kück et al. 2009).

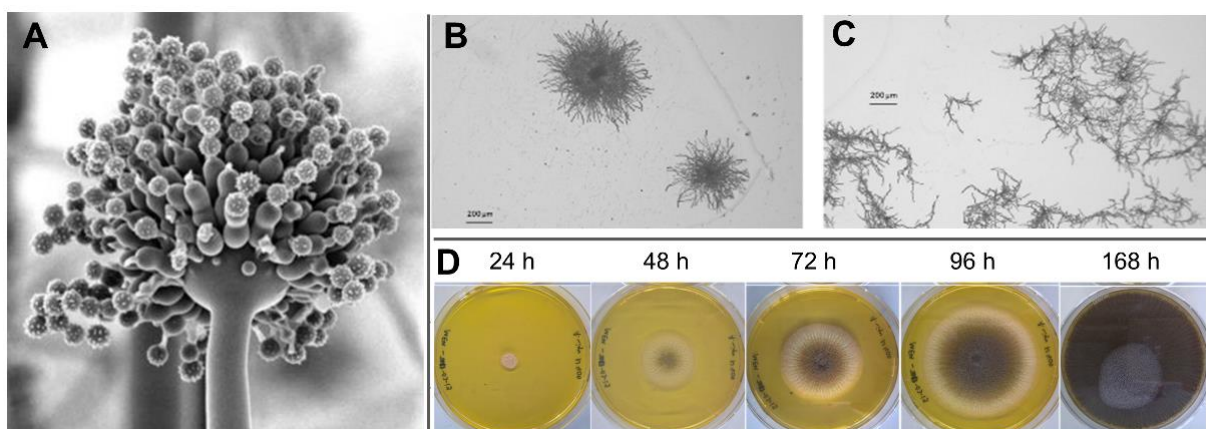


Abb. 3.1.1: Morphologische Aufnahmen von *Aspergillus niger*. (A) Aufnahme mittels Tieftemperatur-Rasterelektronenmikroskopie (TTREM), (B) pelletartige und (C) dispers, myzelartige Morphologie in Submerskultivierung, (D) Wachstum und Sporulation auf Agar 24 bis 168 h (Lu et al. 2015; Read 1991).

Als typischer Vertreter der Bodenpilze ist *A. niger* hauptsächlich im Erdreich habituiert, in dem er aerob auf organischer Substanz wächst und damit einen essenziellen Bestandteil eines gesunden Ökosystems darstellt. Er kann jedoch auch in vielen verschiedenen Habitaten innerhalb aller Klimazonen gefunden werden (Kück et al. 2009; Schuster et al. 2002). Dabei ernährt er sich saprophytisch (chemoorganotroph) durch Aufnahme von abgebauten Nährstoffen (Mono- oder Oligomere), die zuvor durch eigens sekretierte, extrazelluläre Enzyme aus pflanzlicher Biomasse freigesetzt wurden. Dabei werden die Nährstoffe direkt und nicht durch Pino- oder Phagozytose aufgenommen (Fuchs 2007).

Seine höchst flexiblen Umweltaforderung, die ihn zu einem Wachstum und Überleben in einem breiten Temperaturbereich von 10-50 °C (Optimum bei 35-37 °C), bei pH Werten zwischen pH 2-11, Salinitäten von 0-34 % und Wasseraktivitäten von 0,6-1 befähigen, sichern im Zusammenspiel mit der Bildung von sehr widerstandsfähigen Sporen, den Fortbestand der Art (Kis-Papo et al. 2003; Kück et al. 2009; Lubertozzi & Keasling 2009; Meyer et al. 2011; Schuster et al. 2002).

Mit circa 250 beschriebenen Arten und rund zehn bekannten Genomsequenzen, wovon 2007 die erste vollständige Sequenz von *Aspergillus niger* publiziert wurde (Pel et al. 2007), ist die Gattung *Aspergillus* eine der meist erforschten im Phylum der Ascomycota (Geiser et al. 2007; Meyer et al. 2011). Aufgrund dieser Tatsache und ihres ubiquitären Vorkommens ohne Anzeichen von Pathogenität für gesunde Menschen wurden zahlreiche Pilze der Gattung, darunter auch *A. niger*, von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) als unbedenklich für die menschliche Gesundheit eingestuft. Daher erhielten industrielle Verfahren zur Herstellung von Enzymen und Metaboliten mit *A. niger* schon zu Beginn der 1960er Jahre den GRAS-Status (generally recognized as safe), wodurch sie bei der Herstellung von Lebensmitteln und Therapeutika für den Menschen bevorzugt eingesetzt werden (Conesa et al. 2001; Schuster et al. 2002).

Pilze haben durch ihre hoch flexiblen Umweltaforderungen, sekretorische Kapazität und die Fähigkeit der posttranslationalen Modifikation heterolog und homolog hergestellter Proteine Vorteile im Vergleich zu Produktionsverfahren mit anderen Mikroorganismen und werden deshalb bevorzugt in industriellen Herstellungsverfahren eingesetzt. Oftmals können kostengünstigere pflanzliche Polymere wie Stärke, (Hemi-)Cellulose, Xylan, Pektin oder Saccharose zur Kultivierung eingesetzt werden. Durch Sekretion lytischer Enzyme werden diese in ihre Monomere abgebaut, die dem Pilz wiederum als Kohlenstoffquelle dienen, sodass eine nachhaltige und ökonomische Verwendung von erneuerbaren Ressourcen ermöglicht wird (Mäkelä et al. 2018; Meyer et al. 2011).

Das Anwendungsfeld von Pilzen der Gattung *Aspergillus* ist umfangreich und reicht von der Produktion organischer Säuren über Enzyme bis hin zu einer Vielzahl an therapeutischen Wirkstoffen (Cairns et al. 2018). Bei der Herstellung von Enzymen handelt es sich meist um Enzyme für den Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie (Amylasen, Protasen, Pektinasen), der Futtermittelindustrie (Phytasen, Xylanasen), der Biokraftstoffindustrie (Glucoamylasen, Invertasen, Hemicellulasen) und der Reinigungsmittelindustrie (Lipasen, Endo-Glucanasen, Pektinasen). Dabei können Enzymkonzentrationen von bis zu 30 g L⁻¹ Protein produziert werden. (Benoit et al. 2012; Conesa et al. 2001; Geiser et al. 2007; Krull et al. 2010; Lubertozzi & Keasling 2009; Meyer et al. 2011; Meyer et al. 2016; Papagianni 2004). Auch die nach Abschluss der Kultivierung notwendige Aufarbeitung zur Abtrennung des Zielmoleküls bringt bei der Verwendung von filamentösen Pilzen Vorteile mit sich, da durch die Zellmorphologie und die extrazelluläre Sekretion eine Abtrennung erheblich erleichtert wird (Lubertozzi & Keasling 2009).

Industriell wird *A. niger* vor allem zur Produktion von Enzymen und organischen Säuren eingesetzt (99 % Ausbeute bei der Herstellung von Citronensäure bezogen auf die eingesetzte Substratmenge). Dabei wurde beispielsweise das Herstellungsverfahren von Citronensäure, welches bereits seit circa 100 Jahren etabliert ist, durch stetige Prozessentwicklungen verbessert, sodass heutzutage Produktkonzentrationen von 140 g L⁻¹ bis 200 g L⁻¹ erreicht werden können (Magnuson & Lasure 2004; Sahm et al. 2013).

3.1.2 Wachstum und Morphologie filamentöser Pilze

Aufgrund der starken Beziehung zwischen der pilzlichen Morphologie und ihrer Produktivität, ist die Beobachtung und Kontrolle der sich ausbildenden zellulären Strukturen von entscheidender Bedeutung zur Charakterisierung und Verbesserung eines Produktionsprozesses mit filamentösen Pilzen (Krull et al. 2010). Das filamentöse Wachstum beruht auf einem komplexen mikromorphologischen Differenzierungsprozess von der Spore über entstehende Keimschläuche hin zur Hyphe und resultiert in unterschiedlichen makromorphologischen Erscheinungsformen. Die Mikromorphologie beschreibt dabei hauptsächlich das Myzelwachstum, welches sich aus der Längenextension durch polares, apikales Wachstum der Hyphen, deren Kompartimentierung und der Erhöhung wachsender Regionen durch Verzweigung zusammensetzt. Makromorphologisch hingegen werden die drei Erscheinungsformen frei disperses Myzel, distinkte sphärische Agglomerate, sogenannte Pellets, und Mischformen aus beidem („clumps“) unterschieden (Krull et al. 2010; Weuster-Botz & Takors 2018). Zum Ende des Lebenszyklus werden wieder Sporen gebildet, sodass die Spore sowohl als Ausgangs- als auch als Endpunkt dieses Wachstumsprozess gesehen werden kann (Papagianni 2004).

Mikromorphologie - Auskeimphase

In der Anfangsphase der Kultivierung beginnt das Wachstum durch den mikromorphologischen Prozess des Auskeimens der Sporen. Bei der Anwesenheit bestimmter Nährstoffe in der Umgebung der Sporen kommt es zu einem zweiphasigen Auskeimungsprozess. In der ersten Phase wird die Spore durch die vorliegenden Nährstoffe aktiviert und es kommt zu einer isotropen Quellung der Spore. In der zweiten Phase formt sich aus der Spore ein Keimschlauch der sich dann durch apikales Spitzenwachstum zu einer Hyphe entwickelt (Abdel-Rahim & Arbab 1985; Hayer et al. 2014). Es gibt jedoch auch Regulationsmechanismen, die das Auskeimen der Sporen aufgrund von äußeren Umweltfaktoren verhindern (Padder et al. 2018). Dazu zählt das sogenannte Quorum sensing, einer Art Autoregulation des Populationslevels, der es Zellen ermöglicht über die Konzentration bestimmter Botenstoffe im Medium die eigene Populationsdichte ermitteln und regulieren zu können. Einige Mikroorganismen, darunter auch *A. niger*, sind sensitiv für Botenstoffe wie Farnesol, Tyrosol, Octenol oder α -(1,3)-glucan, die bereits in nanomolaren Konzentrationen Wirkung zeigen (Barrios-Gonzalez et al. 1989; Chitarra et al. 2004; Hobot & Gull 1980; Hogan 2006). Mit der im Medium gelösten CO_2 -Konzentration konnte ein weiterer Modulator des Auskeimungsverhaltens von *A. niger* gefunden werden. Bei einer CO_2 -Konzentration von 0,5 % im Medium keimen zwischen 70-90 % der Sporen erfolgreich aus (Vakil et al. 1961). Bei geringerer Konzentration verringert sich die Auskeimungsquote, sodass bei 0,04 % CO_2 (Luftsättigung) nur rund 15-20 % der Sporen auskeimen. Ab einer CO_2 -Konzentration von 3 % kommt es zur vollständigen Inhibition der Auskeimung (Vakil et al. 1961).

Mikromorphologie - Hyphenwachstum & exponentielles Wachstum durch Verzweigung

Nach der Reifung des Keimschlauchs zur Hyphe ist nur noch an der Hyphenspitze Wachstum zu beobachten (Lin et al. 2014). Dieses apikale Wachstum ist ein Resultat aus der Fusion spezieller Transportvesikel mit der Zellmembran an der Hyphenspitze. Dort sammeln sich die Vesikel und bilden den "Spitzenkörper", eine dichte, kugelförmige Ansammlung von Vesikeln, Zytoskelettkomponenten, Ribosomen und Signalproteinen, die für effizientes apikales Wachstum erforderlich ist (Lin et al. 2014). Nach einer initialen Beschleunigungsphase erfolgt das weitere Wachstum mit maximaler Geschwindigkeit, wobei der Vesikeltransport der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Grimm et al. 2005a; Lin et al. 2014). Nach mehreren Mitosezyklen bildet sich am basalen Ende des Keimschlauches ein erstes Septum, das die Hyphen in ein apikales und ein subapikales Kompartiment teilt. Diese Septen besitzen einen zentralen Porus, der den Weg für den Stofftransport entlang der Hyphe sicherstellt.

Während des Längenwachstums entstehen weitere Verzweigungen, die anschließend auch apikal wachsen (Fritsche & Lay 2016; Fuchs 2007; Kück et al. 2009). Die Bildung der Septen unterteilt die Zellen somit in apikale, subapikale und Hyphenkompartimente, wobei nur apikale und subapikale Kompartimente zum Wachstum beitragen (Weuster-Botz & Takors 2018). Mit fortschreitender Ausdehnung werden weitere Septen gebildet und die apikalen Kompartimente wandeln sich in subapikale Kompartimente um (McIntyre et al. 2001). Aufgrund von verschiedenen Polaritätsachsen der Hypen, kommt es zur Bildung von Seitenästen, die aus der Ansammlung von nicht durch die Septum-Querwände gelangenden Transportvesikeln resultieren. Außerdem bilden sie sekundäre Keimschläuche, sobald sie durch ein Septum von der primären Hyphe getrennt werden (Lin et al. 2014). Verzweigung und Spitzenausdehnung ermöglichen das exponentielle Wachstum von filamentösen Pilzen und bestimmen so die gesamte spezifische Wachstumsrate (Pazouki & Panda 2000).

Das resultierende stark verzweigte Hyphengeflecht, welches auch als Myzel bezeichnet wird, wird zusätzlich durch Anastomosen untereinander verbunden und in Substrat-, Oberflächen- und Luftmyzel unterteilt. Das Substrat- und Oberflächenmyzel wächst invasiv in das Substrat hinein und dient zur Ernährung des Pilzes, wohingegen das Luftmyzel in Kontakt mit Luft kommt, woraufhin es Konidien zur Verbreitung des Pilzes ausbildet (Fritsche & Lay 2016; Fuchs 2007; Kück et al. 2009). In Abbildung 4.1.2 ist eine schematische Darstellung des Lebenszyklus und der Morphogenese des filamentösen Pilzes *A. niger* dargestellt.

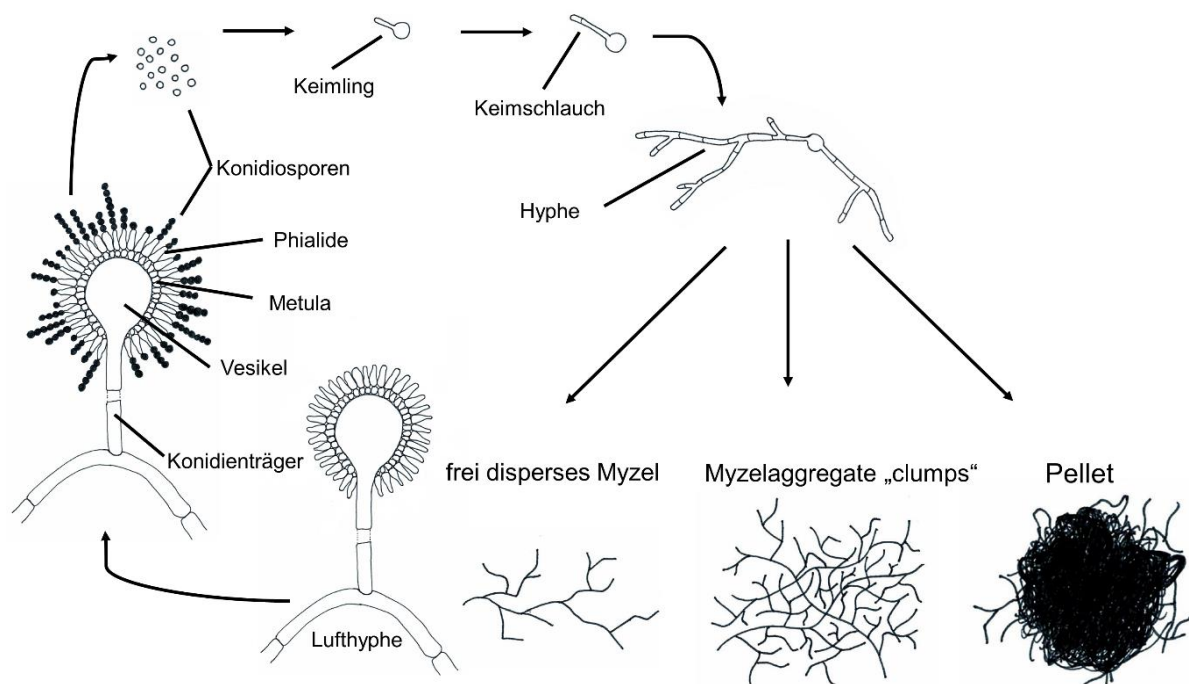


Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus und der Morphogenese von *Aspergillus niger*. Angepasst nach Cox et al. (1998), Fuchs (2007), Kück (2009) und Meyer et al. (2015).

Makromorphologie

Während der Submerskultivierung filamentöser Pilze kann das makromorphologische Erscheinungsbild stark variieren. In Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen können dabei frei disperses Myzel, zusammenhängende Anordnungen von Myzelaggregaten (clumps) oder distinkte sphärischen Pellets beobachtet werden (Grimm et al. 2005a; Papagianni 2004). Die während der Kultivierung ausgeprägte Makromorphologie des Pilzes hat starken Einfluss auf seine Produktivität und auf die verfahrenstechnischen Anforderungen des Produktionsprozesses.

Während der Kultivierung mit frei dispersem Myzel als Hauptmorphologieform bildet sich ein weitverzweigtes Netzwerk von Hyphen aus, das zu einer deutlichen Erhöhung der Viskosität des Kulturmediums beiträgt. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines nicht-Newtonschen Rheologieverhalten der Mediensuspension (Metz & Kossen 1977; Papagianni 2004). Um die dabei im Rührkesselreaktor entstehenden Transportlimitierungen zu umgehen, ist ein hoher Energieeintrag erforderlich, der für eine angemessene Durchmischung und Belüftung sorgt und die Ausbildung von Temperatur- und Nährstoffkonzentrationsgradienten unterbindet (Papagianni 2004). Das pelletartige Wachstum hat dagegen nur einen geringfügigen Einfluss auf die Medienrheologie, weshalb zur Durchmischung und Begasung des Rührkesselreaktors niedrigere Leistungseinträge nötig sind. Während die Abtrennung der Biomasse durch pelletartiges Wachstum vereinfacht wird, besteht ein großer Nachteil dieser Morphologie in der Begrenzung des Stofftransport aus dem Kultivierungsmedium in den inneren Bereich der Pellets (El-Enshasy et al. 2006; Papagianni 2004).

Bei der Ausbildung von Pellets spielt die Interaktion der Sporen untereinander aufgrund ihrer physikochemischen Oberflächenbeschaffenheit (Oberflächenladung, Hydrophobizität) eine große Rolle. Es gibt sowohl koagulierende als auch nicht koagulierende Sporen filamentöser Mikroorganismen. Bei nicht-koagulierenden Sporen kommt es nicht zur Aggregation mehrerer Sporen sodass ein Pellet aus einer einzelnen Spore gebildet werden kann. Die entstehende Pelletkonzentration steht dabei in enger Beziehung mit der Anzahl an Sporen. *A. niger* Sporen hingegen gehören zu den koagulierenden Sporenbildnern, bei denen die Aggregation der Sporen schon vor der Auskeimung und dem weiteren Wachstum stattfindet, sodass die Pelletkonzentration deutlich geringer ist als die Sporenkonzentration (Dynesen & Nielsen 2003; Metz & Kossen 1977). Grimm et al. (2004) konnten zeigen, dass der Pelletbildung von *A. niger* zwei eindeutig unterschiedliche Schritte zugrunde liegen, die maßgeblich vom pH und den fluiddynamischen Bedingungen im Rührkesselreaktor beeinflusst werden. Unmittelbar nach Inokulation der Sporen kommt es in einem primären Schritt zur Bildung von Sporenaggregaten bis zur Einstellung eines Zerfall-Aggregations-Gleichgewichts. Die nach Keimung der Sporen entstehende Hyphenoberfläche, an die Sporen anhaften können, löst einen sekundären

Aggregationsschritt aus, der zur drastischen Verringerung der Partikelkonzentration führt, weshalb der zweite Aggregationsschritt die größere Rolle in der Pelletbildung von *A. niger* spielt. Nach Entstehung eines Pellets wächst es mit einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einem kritischen Radius, ab dem es zu Stofftransportproblemen ins Innere des Pellets kommt, sodass die Zellen dort aufgrund von Sauerstoff- und Nährstofflimitierung absterben (Wucherpfennig et al. 2010).

Alle vorkommenden Phänotypen haben prozesstechnisch sowohl Vor- als auch Nachteile. Die benötigte Morphologie ist deshalb immer abhängig vom gewünschten Produkt. Während eine pelletartige Morphologie beispielsweise zu einer höheren Ausbeute von Zitronensäure und Glucoamylase führt, ist filamentöses Wachstum vorteilhaft für die Produktion von pektinolytischen Enzymen oder Fumarsäure (Pazouki & Panda 2000). Durch den starken Einfluss der pilzlichen Morphologie auf die Produktivität wurden viele Studien angeregt, diese sowohl durch verfahrenstechnische und als auch molekularbiologische Vorgehensweisen zu beeinflussen und sogar kontrollieren zu können. Verfahrenstechnisch wurde dabei unter anderem der Einfluss der Inokulationsdichte, des mechanischen Leistungseintrags, der Sauerstoffanreicherung der Begasungsluft, des pH, der Kohlenstoffquelle, der Verfügbarkeit von Mangan, der Addition von inerten Mikropartikeln und der Osmolarität untersucht (Grimm et al. 2005a; Kelly et al. 2004; Papagianni et al. 1998; Papagianni 2004; Wucherpfennig et al. 2010). Zusätzlich wurden genetische Veränderungen untersucht, bei denen die Morphologie durch Erhöhung des Verzweigungsgrads der Hyphen beeinflusst wurde, wodurch die sekretorisch aktive Oberfläche erhöht werden konnte (Cairns et al. 2018). Von den untersuchten Variablen werden die Inokulationsdichte, der pH und der volumetrische Leistungseintrag durch Rühren und Belüften allgemein als die wichtigsten Einflussgrößen auf Morphologie und Produktivität in der Submerskultivierung filamentöser Pilze betrachtet (Wucherpfennig et al. 2010).

Viele Studien konnten zeigen, dass die Sporenkonzentration des Inokulums zu Beginn der Kultivierung einen großen Einfluss auf die Morphologie und damit auch auf die Produktivität der Pilzzellen hat (Bizukoje & Ledakowicz 2010; Grimm et al. 2004; Papagianni 2004). Es wurde der Einfluss der Sporenkonzentration auf die Aggregationsgeschwindigkeit, die entstehende Morphologie und die spätere Produktivität untersucht. Durch Erhöhung der Sporenkonzentration steigt die Aggregationsgeschwindigkeit, sodass dadurch die Partikelwachstumsrate erniedrigt wird, was das Auskeimen der Sporen und das Hyphenwachstum deutlich verlangsamen kann (Grimm et al. 2004). Die Morphologie konnte dahingehend beeinflusst werden, dass mit steigender Sporenkonzentration der Pelletdurchmesser abnimmt. Ab einer Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} konnte dann wiederum disperses Myzel beobachtet werden (Xu et al. 2000).

Eine weitere wichtige Prozessvariable ist der pH (Grimm et al. 2005b; Vats et al. 2004). Dabei hat der pH einen starken Effekt auf die beiden Schritte der Sporenaggregation und damit auch auf die sich ausbildende Morphologie. Bei saurem pH entsteht disperses Myzel wohingegen bei höherem pH eher Pellets gebildet werden, da sich durch Änderung der Oberflächenladung der Sporen das Aggregationsverhalten ändert (Grimm et al. 2005b). Bekannt ist auch, dass durch gezielten Einsatz des pH das Wachstum hin zu dispersem Myzelium gesteuert werden kann (Driouch et al. 2010).

Der Einfluss eines variierenden mechanischen Leistungseintrags wurde ebenfalls detailliert analysiert (Papagianni 2004; Wucherpennig et al. 2010). Beispielsweise konnte bei der Untersuchung der Glucoseoxidaseproduktion festgestellt werden, dass es bei niedrigem Leistungseintrag zur Ausbildung von Pellets kommt und bei hohem Leistungseintrag fast ausschließlich myzelartiges Wachstum beobachtet werden kann (El-Enshasy et al. 2006). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Untersuchung der Citronensäureproduktion mit *A. niger* gemacht werden. Zudem wurde beschrieben, dass es wiederum bei sehr hohen Leistungseinträgen auch zur Ausbildung von Pellets kommt. Diese sind jedoch kompakter im Gegensatz zu den bei niedrigem Leistungseintrag beobachteten und eher als „fluffig“ beschriebenen Pellets (Papagianni et al. 1998; Papagianni 2004). Die morphologische Anpassung an den Leistungseintrag resultiert aus der auf die Pilzzellen ausgeübten Scherung des Rührwerks. Bis zu einem bestimmten Leistungseintrag kommt es zur oben beschriebenen Pelletbildung basierend auf der Sporenaggregation. Wird dieser Leistungseintrag überschritten wird das morphologische Erscheinungsbild durch die Fragmentierung der Hyphen bestimmt, so dass sich ein filamentöses Netzwerk ausbilden kann. Sobald dann ein zu hoher Leistungseintrag gewählt wird, bilden sich kompakte runde Pellets, da die Hyphen durch ständige Scherung eher in das Innere des Pellets hineinwachsen und somit die geometrisch stabilste Form einer Kugel annehmen. Weitere Studien mit *A. niger* untersuchten den Einfluss der Medienzusammensetzung, bei denen festgestellt werden konnte, dass unterschiedliche Medienzusammensetzungen die Morphologie und damit auch die Produktivität des Pilzes beeinflussen (El-Enshasy et al. 1999; Rubio & Navarro 2006).

3.1.3 Regulation der Genexpression pektinolytischer Enzyme

Filamentöse Pilze eignen sich aufgrund ihrer hohen sekretorischen Kapazität besonders gut zur Herstellung von Proteinen, Enzymen, organischen Säuren und anderen Metaboliten. Die zur Sekretion bestimmten Enzyme beginnen ihre Reise im Endoplasmatischen Retikulum. Dort werden sie final gefaltet und unter anderem durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Disulfidbrückenbindung modifiziert. Anschließend gelangen sie über Transportvesikel zum Golgi-Apparat, in dem sie weiter modifiziert und schlussendlich an die Hyphenspitzen transportiert werden. In der apikalen Region der Hyphenspitzen werden die Enzyme hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, ins extrazelluläre Medium sekretiert (Conesa et al. 2001; Lin et al. 2014; Meyer et al. 2015).

Bevor es jedoch zur oben beschriebenen Sekretion der Enzyme kommt, muss zuallererst die Expression des zu sekretierenden Enzyms auf genetischer Ebene ausgelöst werden. Im Falle des Abbaus von pektinreicher Biomasse gibt es einen genau abgestimmten Regulationsmechanismus der Genexpression, um diese Kohlenstoffquelle ideal verwerten zu können. Für diese Kontrolle stehen dem Pilz eine Reihe an Transkriptionsfaktoren zur Verfügung.

In Anwesenheit einer präferierten Kohlenstoffquelle (beispielsweise Glucose) verhindert die Kohlenstoffkatabolitrepression über den CreA-Repressor die Expression von Genen, die an der Verwertung weniger präferierter Kohlenstoffquellen beteiligt sind (Mäkelä et al. 2018). Dieser CreA-Repressor wird nicht nur durch Glucose, sondern auch durch andere Zucker wie Xylose, Mannose und D-Galacturonsäure aktiviert (Kowalczyk et al. 2014), sodass der Abbau der Polysaccharide Pektin, Cellulose, Xylan und Arabinan in ihrer Anwesenheit weitestgehend unterbunden wird. Kommt es nun zur Aufhebung der Kohlenstoffkatabolitrepression kann die Produktion lytischer Enzyme starten.

Während des Wachstums von *A. niger* auf pektinreicher Biomasse wird vor allem eine erhöhte Konzentration der Transkriptionsfaktoren (TF) GaaR (D-Galacturonsäurefreisetzung), RhaR (Rhamnosefreisetzung) und AraR (Arabinosefreisetzung) beobachtet (Kowalczyk et al. 2014). Die Bindung des Transkriptionsfaktor GaaR ist für die Expression der Gene und die damit verbundene Verwertung der pektinreichen Biomasse essenziell (Alazi et al. 2018; Niu et al. 2017). Ein weiterer Regulationsmechanismus der Gene des D-Galacturonsäure-Regulons ist die negativ Kontrolle des Repressors GaaX. Dieser inhibiert die Aktivität des transkriptionellen Aktivators GaaR in Abwesenheit eines Induktors (Niu et al. 2017).

3.2 Bioprozesstechnik

3.2.1 Kultivierung und Wachstumskinetik im Rührkesselreaktor

Ogleich sich dieses Kapitel hauptsächlich mit der Kultivierung filamentöser Pilze im Rührkesselreaktor beschäftigt, soll kurz auf eine weitere Form der Kultivierung dieser Mikroorganismen eingegangen werden. Dabei handelt es sich um die Kultivierung der Pilze auf einer feuchten, nährstoffliefernden Feststoffphase, welche von einer kontinuierlich erneuerten Gasphase umgeben ist (engl. solid-state cultivation). Die Kultivierung, die häufig im Oberflächen- oder Festbettverfahren durchgeführt wird, bietet neben der hohen Ähnlichkeit zum natürlichen Habitat des Pilzes hohe Produktivität und Produktkonzentration im Labormaßstab. Vorteile dieses Verfahrens sind unter anderem ein verringertes Kontaminationsrisiko (niedrige Wasseraktivität, saures Milieu), eine verringerte Katabolitrepression aufgrund des extrazellulären Abbaus von Polysacchariden und die Verwendbarkeit wasserunlöslicher Substrate. Der jedoch entscheidende Nachteil ist die Ausbildung von Gradienten während der Kultivierung. So entstehen Temperatur-, pH-, Substrat-, Feuchtigkeit- und Sauerstoffgradienten, die die Kontrolle des Prozesses erschweren. Hinzu kommt das anspruchsvolle Prozessmonitoring. Diese Nachteile fallen vor allem bei der Maßstabsvergrößerung stärker ins Gewicht, was eine ökonomische Produktion im Großmaßstab mittels Feststoffkultivierung erschwert (Berenjian 2019; Meyer & Schmidhalter 2014).

Das alternative und in der Industrie etablierte Verfahren ist die Submerskultivierung, bei der wasserbasierte Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen in Suspension verwendet werden. Bei der industriellen Kultivierung von Pilzen zur Herstellung von Bioprodukten werden vornehmlich zwei Rührkesselreaktorarten angewandt. Diese werden anhand des Leistungseintrags in Rührkesselreaktoren mit mechanisch bewegten Einbauten (Rührkesselreaktor) und Rührkesselreaktoren mit Leistungseintrag durch Gasexpansion (Blasensäulenreaktoren) eingeteilt. Generell haben alle Rührkesselreaktoren, so auch der in dieser Arbeit verwendete Rührkesselreaktor, grundlegende Aufgaben wie das Homogenisieren des Kulturmediums, das Suspendieren von unlöslichen Bestandteilen, das Dispergieren von Sauerstoff im Kulturmedium bei aeroben Prozessen und letztlich auch die Funktion einer Sterilbarriere zur Aufrechterhaltung der Monokultur (Chmiel & Weuster-Botz 2018; Meyer & Schmidhalter 2014).

Während der aeroben Kultivierung von filamentösen Pilzen benötigen die heterotroph wachsenden Mikroorganismen neben Sauerstoff weitere im Medium vorhandene Nährstoffe (Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, Mineralsalze, Vitamine und Spurenelemente). Unter der Annahme, dass durch den Reaktor eine ideal homogene Mischung des Mediums vorliegt und somit ideale Wachstumsbedingungen, kann im Satzverfahren eine Zunahme der Zellmasse als Funktion der Prozesszeit beobachtet werden. Während der Kultivierung werden dann bestimmte Wachstumsphasen durchlaufen, die in Abb. 3.2.1 dargestellt sind. In der ersten Phase, der sogenannten Verzögerungsphase (engl. lag-phase) (1), passt sich der Metabolismus der Zellen an die vorliegenden Reaktionsbedingungen an. Währenddessen ist kein Wachstum zu beobachten und die Biomassekonzentration bleibt konstant. Nach der Adaptation an die Kultivierungsbedingungen beginnen die Zellen zu wachsen (2: erste Übergangsphase) bis sie in der exponentiellen Phase (3) ihre maximale Wachstumsrate erreichen. Durch die Anhäufung inhibierender Stoffwechselprodukte, Veränderung der Reaktionsbedingungen oder Verbrauch des limitierenden Substrats nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit wieder ab (4: zweite Übergangsphase) bis eine stationäre Phase (5) erreicht ist, in der die Biomassebildung und Abnahme im Gleichgewicht stehen. Nach einer gewissen Zeit überwiegt die Sterberate und folglich nimmt die Biomassekonzentration ab (6: Absterbephase) (Weuster-Botz & Takors 2018).

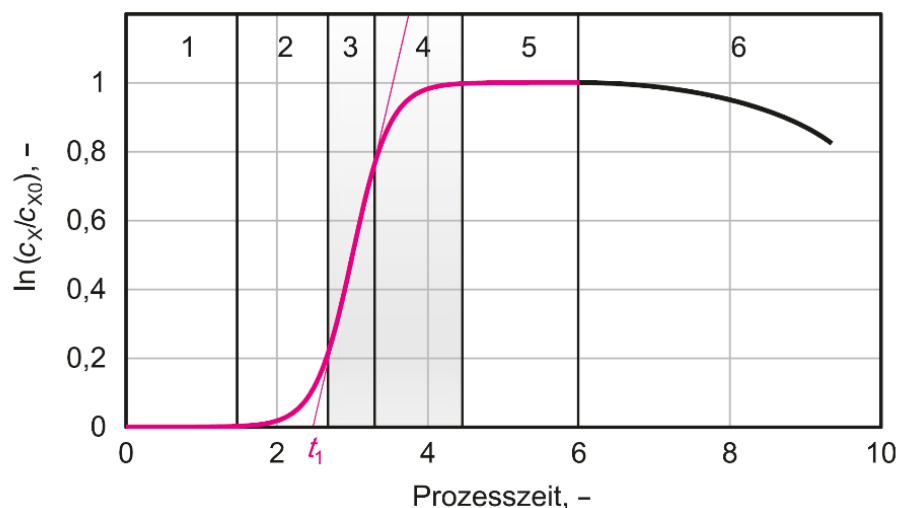


Abb. 3.2.1: Wachstumskurve unter idealen Bedingungen im Rührkesselreaktor aus Weuster-Botz & Takors 2018. 1: Verzögerungsphase; 2: erste Übergangsphase; 3: exponentielle Wachstumsphase; 4: zweite Übergangsphase; 5: stationäre Phase; 6: Absterbephase.

Bei filamentös wachsenden Pilzen teilen sich die Zellen nicht durch Zellteilung, sondern bilden dreidimensionale Hyphennetzwerke aus. Je nach Reaktionsbedingung kann zwischen einem dispers, myzelartigen Wachstum und der Ausbildung dichter Pellets oder deren Mischformen unterschieden werden. Für das Wachstum sind nur die freien Enden der Hyphen, also die apikalen, und subapikalen Kompartimente verantwortlich. Da die Anzahl dieser zum

Wachstum beitragenden Kompartimente durch Septierung und Ausbildung weiterer Verzweigungen variabel sein kann, stellt sie eine charakteristische morphologische Größe dar. Aufgrund dieser morphologischen Einflüsse muss ein strukturiertes Wachstumsmodell unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Einflüsse der Kompartimentierung angewendet werden (Nielsen 1993; Weuster-Botz & Takors 2018). Da nur die apikalen und subapikalen Bereiche in unterschiedlichem Maße zum Wachstum beitragen, müssen diese mit ihren Wachstumsraten und Massenanteilen berücksichtigt werden. Zusätzlich können hierbei neben einer einfachen Sättigungskinetik auch der Erhaltungsstoffwechsel, die Mehrsubstratkinetik und Inhibierungen eingebaut werden. Bei filamentösen Mikroorganismen wird die Beschreibung der Wachstumskinetik und damit auch der Substrataufnahme- und Produktbildungskinetik selbst bei starker Vereinfachung schnell kompliziert. Kommen dann noch die Faktoren Sporulation, hydrodynamische Effekte auf die dreidimensionale Struktur (Fragmentierung) oder Stofftransportlimitierungen im Myzelpellet hinzu, wird die Beschreibung noch aufwendiger. Die hier vorgestellte Beschreibung des Wachstums filamentöser Organismen und der dazugehörige detaillierte mathematische Ansatz ist in Weuster-Botz & Takors 2018 weiterführend beschrieben.

3.2.2 Betriebsweisen von Rührkesselreaktoren

Zur Bilanzierung eines idealen Reaktors wird von einer einphasigen, homogenen Durchmischung innerhalb der Bilanzierungsgrenzen ausgegangen. Dabei wird angenommen, dass keine Gradienten in den Konzentrationen der Reaktionskomponenten und physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung ausgebildet werden. Aus dieser Annahme folgt eine Ortsunabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb des Reaktors. Trotz der starken Vereinfachung ist diese Annahme für eine ausreichend genaue Beschreibung eines Kultivierungsprozess im Labormaßstab, aufgrund der meist guten Durchmischung, geeignet. Mit diesen Annahmen kann für den Rührkesselreaktor folgenden Massenbilanz aufgestellt werden:

$$\frac{\partial m_a}{\partial t} = \frac{\partial(c_a \cdot V_R)}{\partial t} = F_{\text{ein}} \cdot c_{a,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{a,\text{aus}} + r_a \cdot V_R \quad \text{Gleichung 3.1}$$

- Mit:
- m_a Masse der Komponente a, g
 - ∂t Zeitintervall, h
 - c_a Konzentration der Komponente a, g L⁻¹
 - V_R Reaktionsvolumen, L
 - F Volumenstrom, L h⁻¹
 - r_a Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente a, g L⁻¹ h⁻¹

Für Rührkesselreaktoren gibt es drei unterschiedliche Betriebsweisen: das Satzverfahren (geschlossene Bilanzgrenze), Zulaufverfahren (teilloffene Bilanzgrenze) und kontinuierliches Verfahren (offene Bilanzgrenze). Im Satzverfahren, das in dieser Arbeit ausschließlich angewendet wurde, liegen alle für die biologische Stoffumwandlung notwendigen Inhaltsstoffe vor Reaktionsbeginn im Rührkesselreaktor vor. Unter Vernachlässigung des entnommenen Volumens bei Probennahme und der Volumenzunahme bei Regulation des pH durch das benötigte Titrationsmittel, wird das Volumen als konstant betrachtet. Bei aeroben Prozessen wird lediglich sterile Luft über die Bilanzgrenze hinweg eingetragen, sodass sich die Massenbilanz (Gleichung 4.1) folgendermaßen vereinfacht:

$$\frac{\partial c_a}{\partial t} = r_a \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Beim Zulaufverfahren werden Medienbestandteile, wie beispielsweise die Kohlenstoffquelle oder Vitaminlösungen als Funktion der Zeit steril zudosiert, bis das maximale Reaktionsvolumen erreicht ist. Damit können ein unerwünschter Substratüberschuss oder eine Nebenproduktbildung bei zu hoher Substratkonzentration unterbunden werden und die Zellaktivität gezielt über die Substratverfügbarkeit gesteuert werden.

Während einer kontinuierlichen Prozessführung gibt es neben dem Zulaufvolumenstrom auch einen Ablaufvolumenstrom. Dies ermöglicht es, Prozesse in ihrer Hochproduktivphase zu halten, da keine Begrenzung durch das Reaktorvolumen besteht. Dabei werden Zu- und Ablaufvolumenstrom identisch gewählt. Dadurch stellt sich nach einer gewissen Prozesszeit ein Fließgleichgewicht ein, bei dem keine zeitliche Änderung der Zustandsgrößen mehr auftritt. Das kontinuierliche Verfahren kann sowohl mit als auch ohne Zellrückhaltung durchgeführt werden.

3.2.3 Massentransport (Sauerstofftransport) im Rührkesselreaktor

Für aerobe Bioprozesse ist eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff von essenzieller Bedeutung, um optimale Wachstumsbedingungen und eine hohe Produktivität gewährleisten zu können. Aus diesem Grund werden Rührkesselreaktoren in der Regel kontinuierlich mit Druckluft begast. Aufgrund der niedrigen Wasserlöslichkeit von Sauerstoff muss durch Zerkleinerung der Gasblasen eine möglichst große Übergangsfläche generiert werden. In Rührkesselreaktoren bedient man sich spezieller Begasungsorgane, die in Verbindung mit der in lokaler Nähe eingetragenen Rührenergie des Rührorgans zur Dispergierung der eingetragenen Luft beitragen.

Für den Stofftransfer gibt es drei anerkannte Modellvorstellungen: Die Zweifilmtheorie, das Penetrationsmodell und die Theorie der Oberflächenerneuerung. Das Zweifilmmodell findet wegen seiner einfachen Berechenbarkeit und der anschaulichen Natur am häufigsten Anwendung in der Beschreibung des Sauerstofftransports. Deshalb soll auch hier das Zweifilmmodell von Lewis und Whitman herangezogen werden (Abb. 3.2.2) (Whitman 1923; Whitman & Lewis 1924). Die Annahme der Zweifilmtheorie ist eine laminare Grenzschicht auf beiden Seiten der Phasengrenzfläche von Gas und Flüssigkeit. In dieser Grenzfläche basiert der Stofftransport auf Diffusion. An der Phasengrenze befindet sich die übergehende Komponente im Gleichgewicht mit der jeweiligen Phase. Im Phasen Kern selbst ist die Konzentration durch ständige Durchmischung konstant. Der Zusammenhang der Konzentration in der Flüssigphase mit dem Gleichgewichtspartialdruck in der Gasphase kann durch das Henry-Gesetz beschrieben werden (Chmiel & Walitza 2018).

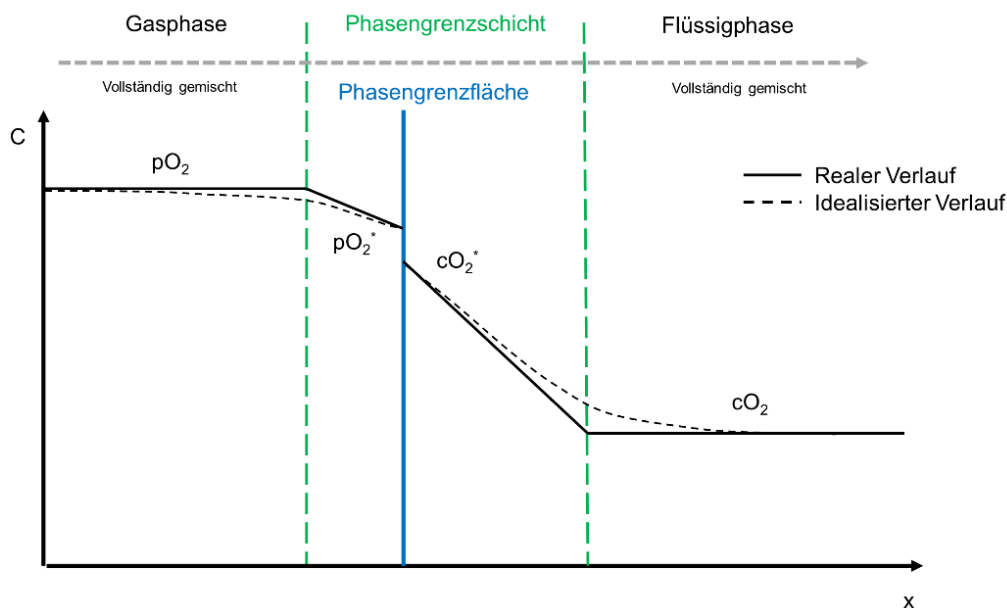


Abb. 3.2.2: Schematische Darstellung der Konzentrationsprofile des Zweifilmmodells in der Gas- und der Flüssigphase (nach Kraume 2012).

Basierend auf der zuvor dargestellten Theorie kann die Sauerstoffeintragsrate (*oxygen transfer rate*, OTR in mol L⁻¹ h⁻¹) wie folgt beschrieben werden (Takors & Weuster-Botz 2018):

$$\text{OTR} = \frac{\dot{n}_{\text{O}_2}}{V_R} = k_L \cdot \frac{A}{V_R} \cdot (c_{\text{O}_2, L}^* - c_{\text{O}_2, L}) = k_L a \cdot (c_{\text{O}_2, L}^* - c_{\text{O}_2, L}) \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Mit	OTR	Sauerstoffeintragsrate, mol L ⁻¹ h ⁻¹
	\dot{n}_{O_2}	Stofftransferrate, mol h ⁻¹
	A	Phasengrenzfläche, m ²
	$k_L a$	Volumetrischer Stofftransportkoeffizient, h ⁻¹
	$c_{\text{O}_2, L}^*$	Sauerstoffkonz. in der Flüssigphase (Gleichgewicht), mol L ⁻¹
	$c_{\text{O}_2, L}$	Sauerstoffkonz. in der Flüssigphase (Kernströmung), mol L ⁻¹

Die Messung der Abgaszusammensetzung in Bezug auf ihren prozentualen Sauerstoff und Kohlenstoffdioxidanteil ermöglicht es, die Sauerstoffaufnahme (*oxygen uptake rate*, OUR in mol L⁻¹ h⁻¹) und die Kohlenstoffdioxidbildungsrate (*carbon dioxide evolution rate*, CER in mol L⁻¹ h⁻¹) der kultivierten Mikroorganismen zu bestimmen. Dabei kann unter Annahme eines gleichen Zu- und Abluftstroms folgende Bilanzierung durchgeführt werden:

$$\text{OUR} = \frac{F_{G, \text{ein}} \cdot y_{\text{O}_2, \text{ein}} - F_{G, \text{aus}} \cdot y_{\text{O}_2, \text{aus}}}{V_R \cdot V_m} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Mit	OUR	Sauerstoffaufnahme, mol L ⁻¹ h ⁻¹
	$F_{G, \text{ein}}$	Zuluftvolumenstrom, L h ⁻¹
	$F_{G, \text{aus}}$	Abluftvolumenstrom, L h ⁻¹
	V_R	Reaktionsvolumen, L
	V_m	Molares Volumen 22,414 L mol ⁻¹ unter Normbedingungen
	$y_{\text{O}_2, \text{ein}}$	Stoffmengenanteil O ₂ in der Zuluft
	$y_{\text{O}_2, \text{aus}}$	Stoffmengenanteil O ₂ in der Abluft

Die Bilanzierung der inerten Gasanteile unter Berücksichtigung des Eingangsvolumenstrom erlauben die Beschreibung des Ausgangsvolumenstroms:

$$F_{G,\text{ein}} \cdot y_{\text{inert,ein}} = F_{G,\text{aus}} \cdot y_{\text{inert,aus}} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$$1 = y_{\text{inert}} + y_{\text{O}_2} + y_{\text{CO}_2} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$F_{G,\text{ein}} \cdot \theta = F_{G,\text{aus}} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Aus den Gleichungen 3.5 bis 3.7 ergibt sich für den Inertgasfaktor θ folgender Zusammenhang:

$$\theta = \frac{1 - y_{\text{O}_2,\text{ein}} - y_{\text{CO}_2,\text{ein}}}{1 - y_{\text{O}_2,\text{aus}} - y_{\text{CO}_2,\text{aus}}} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Unter Berücksichtigung aller Zusammenhänge, lässt sich die Sauerstoffaufnahme wie folgt berechnen:

$$\text{OUR} = \frac{F_{G,\text{ein}} \cdot (y_{\text{O}_2,\text{ein}} - \theta \cdot y_{\text{O}_2,\text{aus}})}{V_R \cdot V_m} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Analog dazu gilt für die Kohlenstoffdioxidbildungsrate:

$$\text{CER} = \frac{F_{G,\text{ein}} \cdot (\theta \cdot y_{\text{CO}_2,\text{aus}} - y_{\text{CO}_2,\text{ein}})}{V_R \cdot V_m} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

In der Regel wird das Wachstum von Zellen über direkte Methoden wie die Bestimmung der Biotrockenmasse, Messung der optischen Dichte oder Zellzählung bestimmt. Aufgrund der Morphologie filamentöser Pilze und der Kultivierung mit suspendierten Zuckerrübenpressschnitzeln wurde die Abschätzung des Zellwachstums anhand der OUR und CER als indirekte Bestimmungsmethode gewählt.

3.2.4 Rheologie

Aufgrund des filamentösen Wachstums von *A. niger* sowie der Eigenschaften des Substrats Zuckerrübenpressschnitzel besitzt das Kultivierungsmedium komplexe rheologische Eigenschaften. Die Interaktion zwischen dem filamentösen Myzel und Substrat resultiert in einem nicht-Newtonschen Fließverhalten, was zu einer variablen, auf der Scherrate basierenden Viskosität führt (Meyer & Schmidhalter 2014). Hinzu kommt ein scherverdünnendes Verhalten des Kultivierungsmediums. Da die Scherrate abhängig von der eingetragenen Leistung durch das Rührwerk ist, nimmt sie mit steigender Entfernung von den Rührern ab. Dies führt zu einer erhöhten Viskosität in den Randbereichen des Rührkesselreaktors und beeinflusst damit den Massentransfer und die Durchmischung, sodass ungewünschte Konzentrationsgradienten entstehen (Posch et al. 2013). Diese Entwicklung der Viskosität ist sehr schwer vorherzusagen, was wiederum dazu führt, dass eine Vorhersage des Massentransfers von Sauerstoff erschwert wird.

Mit zunehmender Viskosität verringert sich der Gas-Flüssig-Stofftransport, da sich sowohl die spezifische Phasengrenzfläche a als auch der Stoffübergangskoeffizient k_L verringern. Aufgrund der hohen Viskosität während der Kultivierung mit myzelartiger Morphologie ist ein erhöhter Leistungseintrag, beziehungsweise eine erhöhte Begasungsrate notwendig, um diese unerwünschten Konzentrationsgradienten zu verhindern. Zur Beschreibung und Bewertung der benötigten Leistung und deren Effekte bei der Kultivierung von Pilzen, bei der die sich ausbildende Morphologie eine wichtige Rolle spielt, hat sich das Kriterium des volumetrischen Leistungseintrags und der Rührerspitzen geschwindigkeit in der Praxis bewährt.

$$\frac{P}{V_R} = \frac{M \cdot 2 \cdot \pi \cdot n}{V_R} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Mit $\frac{P}{V_R}$ Volumetrischer Leistungseintrag, W L^{-1}
 M Drehmoment des Motors, N m
 n Rührerdrehzahl, s^{-1}
 V_R Reaktionsvolumen, L

$$v_{\text{tip}} = \pi \cdot d \cdot n \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Mit v_{tip} Rührerspitzen geschwindigkeit, m s^{-1}
 d Rührerdurchmesser, m
 n Rührerdrehzahl, s^{-1}

3.3 Pektinreiche Agrarreststoffe

3.3.1 Zuckerherstellung aus der Zuckerrübe

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wird neben dem Zuckerrohr aufgrund ihres hohen Zuckergehalts zur wirtschaftlichen Produktion von Saccharose verwendet. Der ubiquitäre Einsatz der Saccharose in der Nahrungsmittelindustrie ist der Grund für den steigenden Saccharosebedarf (Verfünffachung in den letzten 60 Jahren) und das hohe Umsatzvolumen des Zuckermarktes. Weltweit wurden im Produktionsjahr 2019/2020 180 Mio. Tonnen Zucker produziert, wovon circa 24,2 % auf die Prozessierung von Zuckerrüben zurück geht. In der Europäischen Union sind Deutschland, Frankreich und Polen die Hauptproduzenten von Saccharose aus Zuckerrüben. In Deutschland wurden in besagtem Jahr 27 Mio. Tonnen Zuckerrüben zu 4 Mio. Tonnen Saccharose prozessiert. Dabei fielen nach Trocknung von 2,9 Mio. Tonnen Zuckerrübenschnitzel etwa 1,7 Mio. Tonnen Zuckerrübenpressschnitzel als Reststoff an (WVZ e.V. & VdZ e.V. 2021).

Die Zuckerrübe besteht aus rund 75 % Wasser, 18 % Saccharose und circa 5 % Biomasse (Berlowska et al. 2018a). Während ihrer Wachstumsperiode von Frühjahr bis Ende September entsteht der Wurzelkörper, in dem der Zucker gespeichert wird. Abhängig von verschiedenen Wachstumsbedingungen, bewegt sich der Zuckergehalt der Zuckerrübe zwischen 14-20 % und liegt damit etwas höher als der Zuckergehalt des direkten Konkurrenten Zuckerrohr mit 11-16 %.

Zur Gewinnung des Zuckers sind prinzipiell fünf Schritte notwendig (Südzucker AG). Der erste Schritt ist die Ernte der Zuckerrüben und ihr Transport in die Zuckerfabrik, wo sie zunächst gesäubert werden. Der zweite Schritt ist die sogenannte Saftgewinnung. Dabei werden die Zuckerrüben in Schnitzel zerkleinert und bei ca. 70 °C thermisch vorbehandelt, um die Permeabilität der Zellwände zu erhöhen. Anschließend werden die Schnitzel in Extraktionstürmen im Gegenstromverfahren mit heißem Wasser zur Herstellung des Rohsaftes behandelt. Die zurückbleibenden, extrahierten Zuckerrübenschnitzel werden abgepresst, getrocknet, pelletiert und als Viehfutter verwertet. Während des dritten Schrittes wird der Rohsaft, welcher circa 15 % Zucker enthält, mittels Kalkmilch gereinigt. Der dabei entstehende Carbokalk wird abgepresst und kann später als Düngekalk verwendet werden. Endprodukt des dritten Schrittes ist der klare, hellgelbe Dünnsaft. Anschließend wird der Dünnsaft in einer mehrstufigen Verdampfung auf einen Trockensubstanzgehalt von bis zu 75 % eingedickt (Dicksaft). Der in diesem vierten Schritt entstehende Wasserdampf (Brüden) wird in anderen Prozessschritten verwendet, damit ein hoher Ökonomisierungsgrad erreicht werden kann. Der letzte Schritt bei der Zuckerextraktion ist die Kristallisation. Dabei wird der Dicksaft weiterhin thermisch und unter starkem Unterdruck konzentriert bis es zur Kristallbildung kommt. Sobald die Zuckerkristalle

eine bestimmte Größe erreicht haben, können sie mittels Zentrifugation vom Sirup getrennt werden. Der draus gewonnene Weißzucker wird abschließen getrocknet und gelagert und kann durch Umkristallisation in besonders reine Raffinade weiterverarbeitet werden. Der abgetrennte Sirup wird noch weiter prozessiert, sodass in der letzten Stufe die sogenannte Melasse anfällt. Diese enthält den restlichen nicht auskristallisierbaren Zucker und Zuckerrübenbestandteile und wird vorwiegend als kostengünstige Zuckerquelle zur Herstellung von Hefe, Alkohol und Futtermittel eingesetzt.

3.3.2 Zuckerrübenschnitzel in der Bioökonomie

Bei der Prozessierung von Zuckerrüben fallen in Deutschland jährlich etwa 1,5 Mio. Tonnen Zuckerrübenpressschnitzel als Agrarreststoff an. Problematisch für eine gewinnbringende Weiterverarbeitung ist dabei der hohe Energiebedarf, der zur Trocknung (Lagerstabilität), Pelettierung und zum Transport nötig ist. Da dieser Energiebedarf die Gesamtkosten der Zuckerherstellung um circa 30-40 % erhöhen kann, werden die Zuckerrübenschnitzel in vielen Fabriken in nur unwesentlichen Mengen weiterverarbeitet (Richard & Hilditch 2009; Zheng et al. 2012a; Zheng et al. 2012b). Größtenteils werden sie als Futtermittel verwendet, thermisch verwertet oder lediglich in Deponien endgelagert (Berlowska et al. 2015; Ptak et al. 2022).

Für eine biotechnologische Verwertung sind Zuckerrübenschnitzel jedoch von besonderem Interesse. Sie besitzen aufgrund des hohen Zuckerbedarfs der Nahrungsmittelindustrie eine hohe saisonale Verfügbarkeit, werden während der Zuckerherstellung zentral an ihrem Prozessierungsort gesammelt sowie thermisch vorbehandelt und könnten während der Erntesaison durch direkte Verwendung ohne weitere Trocknung energiesparend eingesetzt werden. Weiterhin ist ihr hoher Anteil an Polysacchariden (bis zu 80 %) bei niedrigem Ligningehalt bestens für eine weitere Verwertung als Hauptkohlenstoffquelle geeignet (Kühnel et al. 2011; Sun & Hughes 1998b). Die getrockneten Zuckerrübenschnitzel bestehen aus verschiedenen Kohlenhydraten, Proteinen und Ballaststoffen. Darunter hauptsächlich, bezogen auf ihre Trockenmasse, aus Saccharose (10 %), Cellulose (22-24 %), Hemicellulose (30 %), Pektin (15-25 %), Protein (10,3 %), Lignin (5,9 %), Asche (3,7 %) und Fett (1,4 %) (Berlowska et al. 2018a; Concha Olmos & Zúñiga Hansen 2012; Sun & Hughes 1998b).

Die oben genannten Eigenschaften des Agrarreststoffs haben maßgeblich dazu beigetragen, dass es mittlerweile eine Vielzahl an Ansätzen gibt, um Zuckerrübenschnitzel ökonomisch sinnvoll zu verwerten. Zuckerrübenschnitzel finden aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften als Ballaststoff auch immer mehr Anwendung in der menschlichen Ernährung (Ralet et al. 2009). So sind sie bereits als kommerzielles Produkt Fibrex (Finax AB) im Handel erhältlich. Aufgrund ihrer Textur, Geschmack und der hohen Wasserbindekapazität ist ihre

Anwendung in der Lebensmittelherstellung meist auf die Verwendung als Verdickungsmittel oder Füllstoff limitiert (Finkenstadt 2014).

Auch die in Zuckerrübenschnitzeln enthaltenen Polysaccharide Cellulose und Pektin finden nach ihrer Isolation weitere Verwendung. Die aus Cellulose hergestellten Nanofasern bieten nach weiterer Behandlung eine Alternative zur Verstärkung von Verbundwerkstoffen aufgrund ihrer vorteilhaften mechanischen Eigenschaften und des geringen Gewichts. Zudem bieten ihre Nachhaltigkeit und hohe Verfügbarkeit weitere Vorteile (Leitner et al. 2007; Li et al. 2014). Pektin ist in diversen Nahrungsmitteln hauptsächlich als Gelier- und Bindemittel enthalten. Die gelierenden Eigenschaften werden dabei maßgeblich durch den Veresterungsgrad des Biopolymers bestimmt. Pektine aus Zitrusfrüchten und Äpfeln eignen sich hervorragend für diese Aufgabe, wohingegen das Pektin aus der Zuckerrübe aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften weniger geeignet ist. Im Vergleich zu Pektin aus Früchten hat Zuckerrübenpektin einen niedrigeren D-Galacturonsäuregehalt, ein niedrigeres Molekulargewicht, einen niedrigeren Methylierungsgrad und einen höheren Acetylierungsgrad, weshalb es eher für eine emulgative Wirkung bekannt ist (Berlowska et al. 2018a; Finkenstadt 2014). Es gibt jedoch auch Ansätze bei denen durch Modifikation des Veresterungsgrads die gelierenden Eigenschaften verbessert werden konnten (Turquois et al. 1999).

Ein weiteres Erzeugnis der Zuckerrübenschnitzelhydrolyse sind Pektin-Oligosaccharide, welche potenziell präbiotische Eigenschaften aufweisen. Dabei haben in-vitro-Studien aufgezeigt, dass sie im menschlichen Darm unverdaulich sind und eine Veränderung in der Aktivität und Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota hervorrufen, indem sie das Wachstum probiotischer Bakterien stimulieren (Elst et al. 2018; Gullón et al. 2011).

Ein wichtiger Schritt zur vollständigen Verwertung der Zuckerrübenschnitzel ist die Hydrolyse der Polysaccharide in ihre Monomere zur weiteren Verarbeitung. Dabei kann es aufgrund der komplexen Struktur zu Problemen bei der Zuckerfreisetzung kommen. Aus diesem Grund werden vor allem thermische und chemische Vorbehandlungen gefolgt von enzymatischer Hydrolyse zur vollständigen Freisetzung der Zuckermonomere angewendet. Dabei sind Hydrolyseeffizienzen von bis zu 80 % erreicht worden (Berlowska et al. 2018a; Kracher et al. 2014). Hauptaugenmerk bei der Vorbehandlung liegt in der verbesserten Zugänglichkeit der Cellulose bei gleichzeitig schonender Behandlung der labileren mono- und polymeren Bestandteile, um unerwünschte Abbauprodukte und damit Ausbeuteverluste oder inhibitorische Effekte zu verhindern (Bellido et al. 2015; Kühnel et al. 2011). Die nach der Hydrolyse freigesetzten Monosaccharide sind besonders geeignet, um als Plattformchemikalien zur Herstellung von Bio-kraftstoffen, Produkten der menschlichen Ernährung, Kunststoffen, Kosmetika und pharmazeutisch aktive Substanzen zu fungieren (Finkenstadt 2014).

Ein Ansatz ist die Verwendung von Zuckerrübenschnitzel als Substrat in der Herstellung von Bioethanol (Zheng et al. 2012b). Dabei werden Verfahren, die unter dem Begriff „simultaneous saccharification and fermentation“ (SSF) beschrieben sind, verwendet. Bei diesen liegt das zu hydrolysierende Substrat zu Prozessbeginn im Medium vor, sodass der eingesetzte Mikroorganismus die freigesetzten Zucker verstoffwechseln oder zu dem gewünschten Produkt umsetzen kann (Devos & Colla 2022). Der eingesetzte Mikroorganismus muss jedoch sowohl die im Hydrolysat enthaltene Hexosen als auch Pentosen verstoffwechseln können. Anwendung findet diese Verfahrensvariante vornehmlich bei der Herstellung von Bioethanol aus lignocellulosehaltigen Agrarreststoffen (Ask et al. 2012; Olofsson et al. 2008; Sasaki et al. 2014). Es gibt aber durchaus auch Untersuchungen, bei denen Zuckerrübenschnitzel als Substrat in einem SSF-Prozess zur Herstellung von Milchsäure verwendet wurden (Berlowska et al. 2018b).

Neben der Herstellung von Bioethanol können die Zuckermonomere aus Zuckerrübenpressschnitzeln auch zur Herstellung von Biogas verwendet werden. Dabei wird die Biomasse anaerob zu Methan vergärt. Das Verfahren ist bereits großtechnisch in Biogasanlagen etabliert (Ptak et al. 2022). Vorteilhaft ist die Verwendung von Zuckerrübenschnitzel ohne vorherige Trocknung und Pelettierung. Da jedoch die Umwandlung in Biogas eine geringe Wertschöpfung aufweist, ist diese Art der Verwendung von Zuckerrübenschnitzel aus ökonomischer Sicht zu hinterfragen.

Anstatt die freigesetzten Monosaccharide als Kohlenstoffquelle für die Kultivierung von Mikroorganismen zu verwenden, kann mit der Verwendung der Saccharide für die Bereitstellung von Plattformchemikalien als Ausgangspunkt für die Herstellung diverser höherwertiger Bioprodukte ein weiterer interessanter Ansatz verfolgt werden. Dafür bieten sich mehrere monomere Komponenten der Zuckerrübenpressschnitzel für eine Biokonversion an.

D-Galacturonsäure findet als Basischemikalie Anwendung in der Nahrungsmittel-, Arzneimittel- und Kosmetikindustrie (Baciu & Jördening 2004). Sie kann als Startmolekül für die Herstellung kommerziell relevanter Moleküle wie beispielsweise Ascorbinsäure (Vitamin C), L-Galactonsäure, meso-Galactarsäure oder diverser Aldonsäuren eingesetzt werden (Benz et al. 2014b; Kuivanen et al. 2012; Kuivanen et al. 2015; Mojzita et al. 2010). Dies kann die Kosten der Darstellung dieser Spezialchemikalien durch biotechnologische Verfahren deutlich senken (Schmitz et al. 2019). Besonders interessant für die vorliegende Arbeit ist die Biokonversion zu L-Galactonsäure. Diese hat ähnliche physikochemische Eigenschaften wie die D-Gluconsäure, die standardmäßig in diversen industriellen Anwendungen (Kosmetika, Nahrungsmittel etc.) verwendet wird (Kuivanen et al. 2012). Darüber hinaus kann L-Galactonsäure als Vorstufe in der Ascorbinsäuresynthese (Vitamin C) eingesetzt werden.

L-Arabinose ist eine weitere Komponente der Zuckerrübenschnitzel, die eine Vielzahl an Anwendungen in der Nahrungs- und Arzneimittelindustrie findet. Sie wird in der Herstellung gesunder Nahrungsmittel eingesetzt werden, da sie sich positiv auf den Blutzuckerspiegel auswirkt (Krog-Mikkelsen et al. 2011). Des Weiteren kann sie zum Zuckeralkohol Arabitol reduziert und als Zuckeraustauschstoff in Nahrungsmitteln eingesetzt werden (Ptak et al. 2022). Außerdem kann sie zur Darstellung von L-Gluco-Heptulose verwendet werden, die in der Behandlung von Hypoglykämie und Krebs aufgrund ihrer Fähigkeit, den Zuckerstoffwechsel zu hemmen, eingesetzt wird (Bawn et al. 2018).

Neben den beiden genannten Beispielen befinden sich noch weitere interessante Monomere in den Zuckerrübenschnitzeln, die sich auch als Substrat für diverse Biokonversionen eignen. Darunter auch nicht-Saccharide wie Essigsäure und Ferularsäure. Außerdem können mittels der gelösten Monomere Furfurale hergestellt werden, die eine breite Anwendung in der Treibstoff-, Plastik-, und Lösemittelherstellung finden (Ptak et al. 2022).

3.3.3 Zellwandpolysaccharide der Zuckerrübe

Die pflanzliche Zellwand hat eine dynamische und komplexe Struktur, die primär aus hochmolekularen Polysacchariden, hochgradig glykosylierten Proteinen und Lignin besteht (Somerville et al. 2004). Sie spielt eine Schlüsselrolle in der Stabilität, im Pflanzenwachstum, der Zelldifferenzierung, der interzelluläre Kommunikation, der Wasserregulation und bietet zudem Schutz vor Pathogenen (Cosgrove 2005). Abb. 3.3.1 zeigt eine schematische Darstellung der Pflanzenzellwand. Abhängig vom Entwicklungsstadium und der Lokalisation im Pflanzengewebe unterscheidet sich die Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwand deutlich (Somerville et al. 2004). Die Mittellamelle ist eine gelartige Schicht aus Pektinen, die an der Grenzfläche benachbarter Zellen an der Zell-Zell Interaktion, Zellstruktur und Zellteilung beteiligt ist (Zamil & Geitmann 2017). Die primäre Zellwand besteht aus bis zu drei strukturell unabhängigen jedoch interagierenden Netzwerken. Das Hauptgerüst aus Cellulose und Glucanen ist in ein sekundäres Netzwerk aus Pektin und Hemicellulose eingebettet. Das dritte unabhängige Netzwerk wird durch Strukturproteine gebildet (Carpita & McCann 2002). Die primäre Zellwand wird in die zwei Gruppen Typ I und Typ II eingeteilt. Die Typ I Zellwand kommt bei Dikotyledonen (Zuckerrübe), Monokotylen und Gymnospermen vor und besteht vor allem aus Cellulose, Xyloglycanen und Pektin. Der Aufbau der Typ II Zellwand, die bei grasartigen Pflanzen (lat. Poales) vorkommt, weicht stark von der Struktur der Typ I Zellwand ab, da Xyloglycan und Pektin seltener vorkommen und teilweise durch Glucuronoarabinoxylan ersetzt ist (Carpita & McCann 2002).

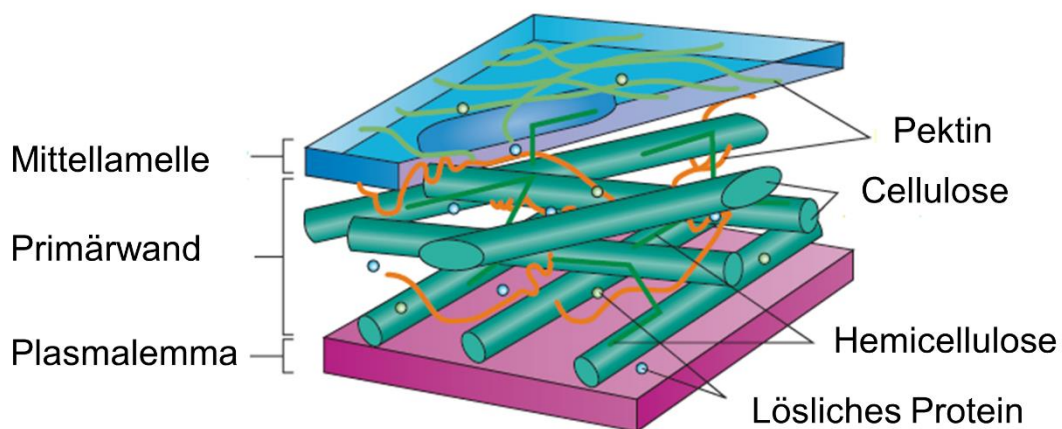


Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Zellwand. Adaptiert nach Sticklen (2018) und Oosterveld (1997).

Die Zellwand der Zuckerrübe besteht, neben Pektin, hauptsächlich aus Cellulose und einem Spektrum an anderen Polysacchariden, die allgemein als Hemicellulose zusammengefasst werden. Diese Zellwandpolysaccharide können bedingt durch ihre Vielfalt an verbauten

Zuckern und deren glycosidischen Bindungen strukturell komplex aufgebaut sein. Für die Bildung dieser komplexen Polysaccharide sind sogenannte Glycosyltransferasen verantwortlich, die die Übertragung verschiedener Kohlenhydratdonatoren unter Ausbildung einer glycosidischen Bindung katalysieren. In den meisten Fällen werden Kohlenhydrate durch Anknüpfung von Uridindiphosphat aktiviert und fungieren anschließend als Donorsubstrat. Akzeptorsubstrate, an die die Kohlenhydrate übertragen werden, sind vielfältig und umfassen vor allem Kohlenhydrate, Aminosäuren, Lipide und Nucleinsäuren (Berg et al. 2018).

Cellulose

Die Cellulose ist mit einem Massenanteil von bis zu 50 % Hauptbestandteil der primären und sekundären Zellwand nahezu aller Pflanzen und ist deshalb das am häufigsten vorkommende Biopolymer der Biosphäre. In der Zellwand hat sie aufgrund ihrer hohen Zugfestigkeit eine stabilisierende Funktion. Jährlich werden circa 10^{15} kg des wasserunlöslichen Zuckerpolymeres sowohl synthetisiert als auch abgebaut. Der Massenanteil von Cellulose liegt bei Zuckerrübenpressschnitzeln bei circa 30 % (Berg et al. 2018; Berlowska et al. 2018a; Pérez et al. 2002; Voet et al. 2010; Zicari et al. 2019).

Cellulose ist ein Homopolymer aus D-Glucose. Nach der β -1,4-glycosidischen Verkettung zweier Glucosemoleküle entsteht Cellobiose. Bei der weiteren β -1,4-glycosidischen Verkettung entsteht ein lineares Polymer, bei dem 500 bis 15.000 Glucoseeinheiten miteinander verknüpft sein können. Die Glucosemoleküle sind aufgrund der β -1,4-glycosidischen Bindung alternierend um 180 Grad um ihre Hauptachse gedreht. Diese langen Ketten sind parallel angeordnet und untereinander durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals Wechselwirkungen stabilisiert und formen Mikrofibrillen, welche einen Durchmesser von 2-20 nm und eine Länge von 100-40.000 nm erreichen können. Durch Gruppierung mehrerer Mikrofibrillen entstehen Makrofibrillen und letztendlich Cellulosefasern. Die daraus entstehende sehr starre Struktur resultiert in Fasern mit hoher Zugfestigkeit. In der Cellulose gibt es Bereiche, die eine hochkristalline Form aufweisen und andere weniger organisierte Bereiche, die meist als amorph bezeichnet werden. Dieser amorphe Bereich ist aufgrund seiner Struktur leichter für Hydrolyseaktivität zugänglich als die kristalline Form. In der Natur kommt die Cellulose meist in Verbindung mit anderen pflanzlichen Biopolymeren wie Hemicellulose (Glucane, Xylane, Mannane, Arabinane, Galactane), Lignin und Pektin vor, sodass deren Abbau auch durch die Heterogenität der Biomasse beeinflusst wird (Berg et al. 2018; Ding & Himmel 2006; Harris & Stone 2008; Houfani et al. 2020; Pérez et al. 2002; Somerville 2006; Voet et al. 2010).

Hemicellulose

Mit einem Massenanteil von rund 30 % der Trockenmasse von Zuckerrübenpressschnitzeln machen weitere Zellwandpolysaccharide, die meistens als Hemicellulosen zusammengefasst werden, einen großen Anteil aus. Sie tragen zur Vernetzung zwischen Cellulosemikrofibrillen bei und sind das zweithäufigste Polymer der pflanzlichen Zellwand. Die häufigsten Hemicellulosederivate in Zuckerrübenpressschnitzeln sind Galactan und Arabinan (Berlowska et al. 2018a). Weitere zu dieser Gruppe gehörende Polysaccharide sind Xylane, Mannane und Glucane. Diese Zellwandpolymere kommen sowohl als Homo- als auch als Heteropolymere vor, die in ihrer Struktur hohe Diversität aufweisen können. Sie bestehen vornehmlich aus den Hexosen D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose und L-Rhamnose und den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose.

Aufgrund der Heterogenität der verbauten Zucker und der Diversität der daraus resultierenden glycosidischen Bindungen ergeben sich verschiedene Eigenschaften und Anforderungen bei der Hydrolyse. Die Polysaccharide liegen meist in amorpher Form vor. Obgleich der dadurch strukturell begünstigten Hydrolyse werden jedoch eine Vielzahl an sehr spezifischen Enzyme benötigt, um die Spaltung der verschiedenen Bindungen zu katalysieren (Glass et al. 2013; Harris & Stone 2008; Houfani et al. 2020; Pérez et al. 2002).

Pektin

Pektin ist strukturell und funktionell das komplexeste Biopolymer der pflanzlichen Zellwand (Abb. 3.3.2). Es spielt in der pflanzlichen Zellwand eine zentrale Rolle bei vielen Prozessen wie Wachstum, Morphogenese, Schutz und Zell-Zell-Adhäsion. In der Nahrungsmittelindustrie wird es als gelierendes und stabilisierendes Polymer verwendet, welches einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit hat. Daher wird es auch in einigen biomedizinischen Anwendungen eingesetzt (Mohnen 2008). Es besteht aus den Galacturonsäurereichen Polysacchariden Homogalacturonan (HG), Rhamnogalacturonan I (RG I) und den substituierten Polymeren Rhamnogalacturonan II (RG II) und Xylogalacturonan (XGA). Für die Synthese des hochkomplexen Biopolymers werden mindestens 67 Enzyme, darunter Glycosyl-, Methyl- und Acetyltransferasen, benötigt (Mohnen 2008).

Homogalacturonan (HG) ist mit ~ 65 % Anteil das Hauptpolymer von Pektin. Der Polymerisierungsgrad des HG in Zuckerrübenpektin ist nur geringfügig niedriger (70-100) als in Zitrus- oder Apfelpektin (100-120) (Ralet et al. 2009). Es handelt sich dabei um ein lineares Homopolymer, welches aus α -1,4-glycosidisch verbundenen D-Galacturonsäuremonomeren (GalA) besteht, die partiell am C-6 Atom methylverestert oder an O-2 und/oder O-3 acetyliert sein können. Dabei beschreibt die Anzahl der Methylierungen und Acetylierungen pro 100 GalA-Einheiten den Methylierungsgrad oder den Acetylierungsgrad (Benoit et al. 2012). In der Literatur wird der Methylierungsgrad mit >60 % und der Acetylierungsgrad mit 10-25 %, abhängig von der Extraktionsmethode des Pektins, angegeben (Sun & Hughes 1998a). Dabei sind rund 75 % der gesamten Acetylierungen in Homogalacturonan und nur 25 % in Rhamnogalacturonan I zu finden (Ralet et al. 2009). Die gelierende Eigenschaft des Pektins beruht auf unmethylierten C-6 Atomen der GalA, die aufgrund ihrer negativen Ladung mit Calciumionen interagieren und so Komplexe mit anderen Pektinmolekülen bilden. Dies ist nur möglich, wenn mehr als zehn unmethylierte GalA-Einheiten aufeinanderfolgend angeordnet sind (Caffall & Mohnen 2009). Der bekannt hohe Methylierungsgrad von Zuckerrübenpektin ist deshalb Grund für die schlechtere Eignung als Geliermittel (Buchholt et al. 2004).

Xylogalacturonan (XGA) besteht aus einem Homogalacturonangerüst mit kurzen Seitenketten aus Xylose und kommt vor allem in reproduktiven Geweben der Pflanzen vor. Die Xylose ist dabei mit dem O-3 Atom der GalA in Form von β -D-Xylose oder β -D-Xylan verknüpft. Die Substitution des HG mit Xylose erhöht den Schutz gegen den Abbau durch Endopolygalacturonasen von Pflanzenpathogenen. Eine ähnliche Struktur hat das Apiogalacturonan, welches anstelle von Xylose Apiose aufweist und bei marinen Monokotyledonen gefunden werden kann (Mohnen 2008; Ridley et al. 2001).

Rhamnogalacturonan I (RGI) besteht aus einem Gerüst aus maximal 20 alternierenden GalA- und Rhamnoseeinheiten, die in $[\alpha$ -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1,4-]_n Abfolge verknüpft sind (Renard et al. 1995). Die in RG I vorkommenden GalA Monomere können am O-2 und/oder am O-3 Atom acetyliert sein. Der Acetylierungsgrad ist dabei abhängig von der Herkunft des Pektins, wobei Zuckerrübenpektin einen relativ hohen Acetylierungsgrad aufweist (Mohnen 2008; Silva et al. 2016). Die Rhamnoseeinheiten sind in O-4 und/oder O-3 Position substituiert. Circa 20-80 % der Rhamnoseeinheiten haben lineare oder verzweigte Seitenketten, die fast ausschließlich aus Arabinose- und Galactoseketten und Mischformen aus beiden Zuckermonomeren bestehen. Diese Seitenketten können über 50 Einheiten lang sein (Mohnen 2008; Silva et al. 2016). Als weiterer, seltener Substituent in RG I kommt D-Glucuronsäure vor (Renard et al. 1995). Des Weiteren können die Arabinose- und Galactoseeinheiten mit Ferularsäure substituiert sein. Die Bildung einer Esterbindung zwischen zwei Ferularsäuren kann zur Erhöhung der Stabilität zwischen Pektinmolekülen beitragen

(Caffall & Mohnen 2009). Aufgrund des hohen Verzweigungsgrad wird RG I auch als „hairy region“ bezeichnet. Diese hochverzweigten Regionen haben in Zuckerrübenpektin einen Anteil von 70 % (Ralet et al. 2009).

Rhamnogalacturonan II ist mit anteilig 10 % das komplexeste Strukturelement des Pektins. Seine Struktur ist hochkonserviert und enthält mindestens acht α -1,4-verknüpfte GalA-Einheiten, die mit hochkomplexen Seitenketten verknüpft sind. Diese Seitenketten bestehen aus 12 verschiedenen Zuckerresten mit mehr als 20 verschiedenen Bindungen (Mohnen 2008). Die Seitenketten können in zwei unterschiedliche Disaccharide (C und D) am C-3 Atom und zwei strukturell unterschiedliche Oligosaccharide (A und B) am C-2 Atom des Grundgerüst eingeteilt werden (Vidal et al. 2000). RG II liegt in Pflanzenwänden in der Regel als RG II-Dimer vor, die durch einen 1:2-Borat-Diolester zwischen den Apiosylresten der Seitenkette A vernetzt wird. Durch diese Dimerisierung zweier RG II Monomere entsteht eine Verbindung zu HG, die daraus entstehende Verbindung bildet ein makromolekulares Netzwerk aus (Mohnen 2008).

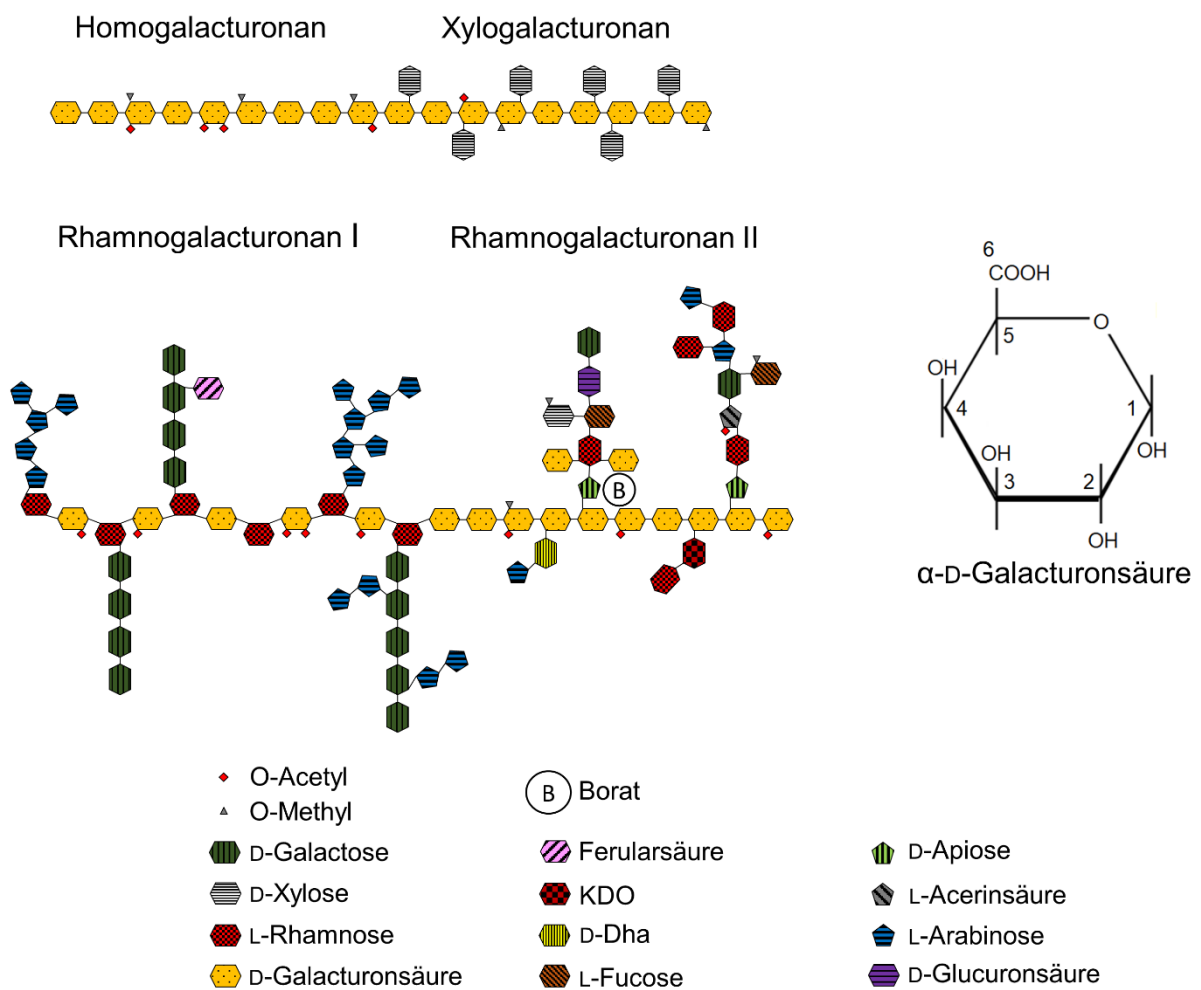


Abb. 3.3.2: Schematische Darstellung der vier Untereinheiten Homogalacturonan, Xylogalacturonan, Rhamnogalacturonan I und II von Pektin und Strukturformel von D-Galacturonsäure. KDO: 2-Keto-3-desoxyoctonat (3-Deoxy-D-manno-octulosonsäure), D-Dha:3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosansäure. Adaptiert nach (Glass et al. 2013; Harholt et al. 2010; Mohnen 2008).

3.3.4 Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln

Für die ökonomische Verwertung von Zuckerrübenpressschnitzeln zur Herstellung von Plattformchemikalien muss eine Hydrolyse der Zuckerpolymeren Cellulose, Hemicellulose und Pektin stattfinden. Dabei wird die Verwendung von Enzymen gegenüber der chemischen Hydrolyse unter heißen und stark sauren Bedingungen bevorzugt, da sie spezifischer, weniger aggressiv und energiesparsamer durchgeführt werden kann (Kühnel et al. 2011; Spagnuolo et al. 1997). Aufgrund der hohen Komplexität der in Zuckerrübenpressschnitzeln enthaltenen Zuckerpolymeren benötigt man für eine effektive Hydrolyse eine Vielzahl an Enzymen, die synergistisch am Abbau zusammenwirken (Semenova et al. 2019). Dabei werden hydrolytische Enzyme benötigt, die Bindungen innerhalb der Polysaccharidketten (endo) trennen, als auch Enzyme, die die endständigen Poly- oder Monosaccharide (exo) abtrennen können. Ein solches perfekt abgestimmtes Enzymgemisch kann von Mikroorganismen wie dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* produziert werden.

Für die Beschreibung von Enzymen, die an der Knüpfung oder Modifikation von glycosidischen Bindungen in Polysacchariden beteiligt sind, kann der Begriff der Kohlenhydrataktiven Enzyme (CAZymes) verwendet werden. Dabei werden die benötigten Enzymaktivitäten in fünf Gruppen eingeteilt: Glycosidasen oder Glykosidhydrolysen (GH), Glycosyltransferasen (GT), Polysaccharid Lyasen (PL), Kohlenhydrat Esterasen (CE) und Hilfsaktivitäten (AA). Die Klassifizierung der Familien wird hauptsächlich für die Analyse und Beschreibung der Fähigkeit eines Organismus oder einer Gemeinschaft von Organismen, komplexe Kohlenhydrate auf- und abzubauen, verwendet. Informationen zu ihnen werden zentral in der CAZy Onlinedatenbank (Carbohydrate Active Enzymes database -<http://www.cazy.org>) gesammelt und aktualisiert (Drula et al. 2022).

Celluloseabbauende Enzyme

Für den Abbau von Cellulose ist das Zusammenwirken der drei Enzyme Cellulase, Cellobiohydrolase und β -Glucosidase erforderlich. Cellulase oder Endoglucanase (GH5, GH7 und GH12) katalysiert die Hydrolyse der β -(1,4)-glycosidischen Bindungen in den amorphen Teilen der Cellulose. Zum weiteren Abbau hin zum Glucosemonomer werden die Enzyme Cellobiohydrolase I und II (GH6, GH7) und β -Glucosidase (GH1, GH3) benötigt. Cellobiohydrolase spaltet dabei Cellobiose von den reduzierenden sowie den nichtreduzierenden Enden der Cellulosekette ab und β -Glucosidase spaltet die entstehende Cellobiose in zwei Glucosemonomere. Außerdem sind nicht-katalytische Proteine, die eine Bindedomäne für Kohlenhydrate aufweisen, gleichermaßen an der Hydrolyse beteiligt, indem sie die kristalline Struktur der

Cellulose aufbrechen und sie so für den enzymatischen Abbau zugänglich machen (Glass et al. 2013; Houfani et al. 2020).

Hemicelluloseabbauende Enzyme

Ein Großteil der Hemicellulosen wird durch die heterogenen Polysaccharide Xylan, Xyloglucan und Galactomannan repräsentiert. Für die katalytische Spaltung in Ihre Monomere werden diverse synergistisch zusammenarbeitende Enzyme benötigt. Der Abbau von Xylan wird von den Enzymen Endo- β -1,4-xylanase (GH10, GH11), α -L-Arabinofuranosidase (GH3, GH10, GH43, GH51, GH 54, GH62), α -Glucuronidase (GH67), Feruloylsterase (CE1) und Acetylxyylanesterase (CE1-CE7) katalysiert. Für den Abbau von Xyloglucan wird Xyloglucanase (GH44, GH74), α -Xylosidase (G31), β -Glucosidase (GH1, GH2, GH3, GH35, GH42), α -L-Arabinofuranosidase, und α -L-Fucosidase (GH1, GH 29, GH30, GH95) benötigt. Galactomannan wird durch Endo- β -1,4-Mannase (GH5, GH7) und α -Galactosidase (GH27, GH36) abgebaut (Glass et al. 2013).

Pektinabbauende Enzyme

Die Hydrolyse der in Abb. 3.3.2 dargestellten hoch komplexen Polysaccharidstrukturen des Pektins benötigt, analog zum Abbau von Hemicellulose, synergistisch zusammenarbeitende Enzyme aus den Gruppen der Glycosidasen (GH), Polysaccharid Lyasen (PL) und Kohlenhydrat Esterasen (CE). Für den erfolgreichen Abbau des am häufigsten in Pektin vorkommenden Polysaccharids Homogalacturonan werden, trotz der vergleichsweise einfachen Struktur, diverse Enzyme benötigt (Abb. 3.3.3). Das Grundgerüst kann durch Exo- und Endopolygalacturonase (GH28) abgebaut werden. Da die Aktivität der Endopolygalacturonase durch die Methylierung der D-Galacturonsäuremonomere behindert wird, werden Pektinmethylesterasen (CE8, CE 12) benötigt, um diese Limitierung zu umgehen. Des Weiteren katalysieren Pektinacetylerasen (CE12) die Deacetylierung des Homogalacturonans. Pektin- und Pektatlyasen spalten das PektinGrundgerüst durch β -Eliminierung, was zur Bildung eines ungesättigten, nichtreduzierenden Endes führt. Pektinlyasen bevorzugen dabei Substrate mit einem hohen Methylierungsgrad, wohingegen Pektatlyasen Substrate mit einem niedrigen Veresterungsgrad bevorzugen (Vries & Visser 2001). Am Abbau des Xylogalacturonan ist zudem das Enzym Endoxylogalacturonanhydrolase (GH28) beteiligt (Glass et al. 2013).

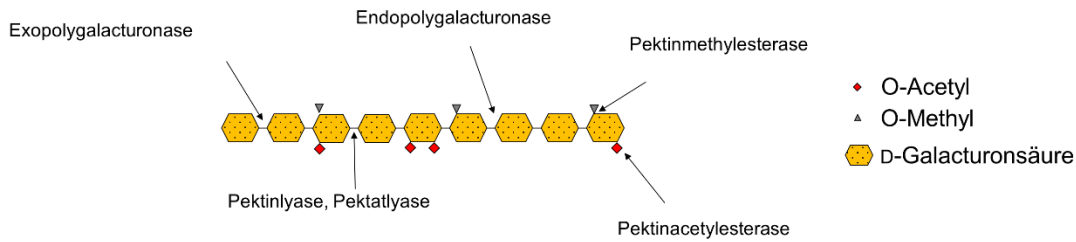


Abb. 3.3.3: Schematische Darstellung der Homogalacturonan abbauenden Enzyme. Adaptiert nach (Glass et al. 2013).

Die Spaltung der vielfältigen Bindungen in Rhamnogalacturonan I (RG I) wird durch eine Vielzahl an verschiedenen enzymatischen Aktivitäten katalysiert (Abb. 3.3.4). Zum Abbau des Rhamnogalacturonan werden die innerhalb des Rückgrats agierenden (endo) Enzyme Rhamnogalacturonase oder Rhamnogalacturonanhydrolase (GH28) und Rhamnogalacturonanlyase (PL4, PL11) benötigt. Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von Rhamnogalacturonase konnten zeigen, dass die katalytische Wirkung deutlich verbessert wird, wenn Rhamnogalacturonanacetylerase (CE12) am Abbau beteiligt ist, was auf eine Behinderung der Aktivität der Rhamnogalacturonase durch die Acetylierung der D-Galacturonsäuremonomere des Rhamnogalacturonan I hindeutet (Silva et al. 2016). Zusätzlich zu den endo-Enzymen sind die weiteren, am terminalen, nichtreduzierenden Ende des Rhamnogalacturonan I agierenden, (exo) Enzyme RG I Rhamnohydrolase, RG I Galacturonohydrolase und Rhamnogalacturonylhydrolasen beteiligt. Die beiden ersten Enzyme spalten jeweils Rhamnose und D-Galacturonsäuremonomere vom nichtreduzierenden Ende des Rückgrats ab, wohingegen sich die Rhamnogalacturonylhydrolaseaktivität dadurch unterscheidet, dass sie nur auf RGI-Oligomere mit ungesättigten GalA-Monomeren am nichtreduzierenden Ende einwirkt (Silva et al. 2016). Am Abbau der Seitenketten sind Arabinanasen (GH43, GH93), Arabinosidasen/ α -Arabinofuranosidasen (GH3, GH43, GH51, GH54 und GH62), Galactanasen (GH5, GH16, GH30, GH35 und GH53), α - und β -Galactosidasen (GH1, GH2, GH4, GH16, GH27, GH35, GH36, GH42, GH43 und GH53), β -Glucuronidasen (GH1, GH2 und GH79) und Feruloylerasen (CE1) beteiligt (Glass et al. 2013). Die Vermutung liegt nahe, dass die bisher beschriebenen Enzyme auch am Abbau des Polysaccharids Rhamnogalacturonan II maßgeblich beteiligt sind. Über spezifische Enzyme für den Abbau von Rhamnogalacturonan II ist bisher jedoch nur wenig bekannt (Bauer et al. 2006; Wong 2008).

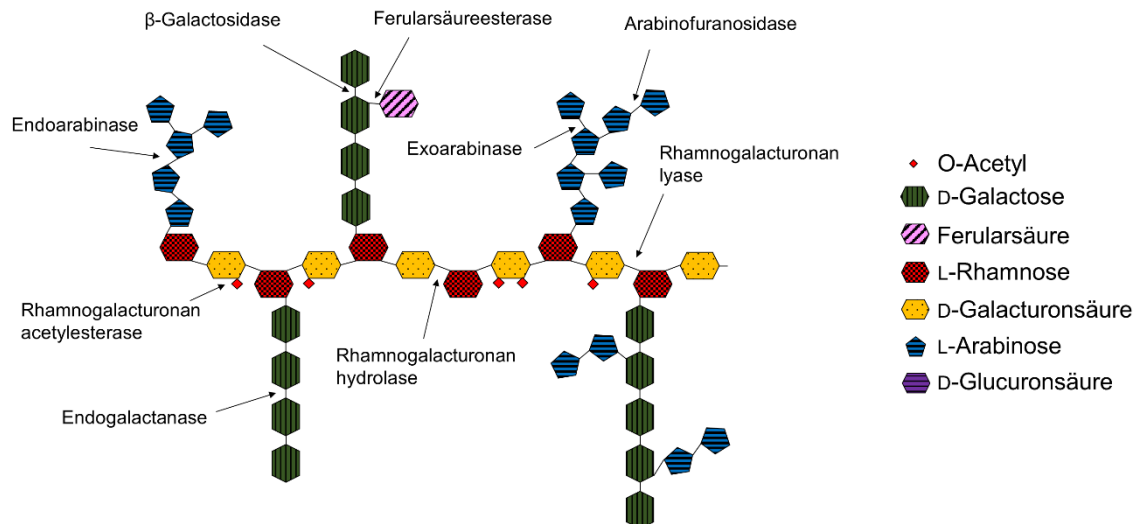


Abb. 3.3.4: Schematische Darstellung der Rhamnogalacturonan I abbauenden Enzyme. Adaptiert nach (Glass et al. 2013).

Enzymatische Ausstattung von *Aspergillus niger* zum Abbau von Pektin

Das Genom von *Aspergillus niger* enthält alle nötigen Gene für die zum Abbau des Pektins notwendigen pektinolytischen Enzyme. Neben Genen für sieben Endo- und fünf Exopolygalacturonasen (GH Familie) können auch sieben Gene für Pektin/Pektatlyasen (PE Familie) darin gefunden werden (Benoit et al. 2012). Die sieben Endopolygalacturonasen unterscheiden sich in ihrer spezifischen Aktivität, ihrer Sensitivität gegenüber der Methylierung des Substrats und ihrem Wirkmechanismus. Vier der Enzyme wirken über einen Mehrfachangriff auf eine einzige Kette, während die anderen drei Enzyme über einen Einzelangriffsmechanismus arbeiten (Vries & Visser 2001). Bisher wurden sechs Gene für Pektinlyasen und ein Gen für Pektatlyase in *A. niger* identifiziert. Die charakterisierten *A. niger* Pektinlyasen bevorzugten Substrate mit einem hohen Veresterungsgrad.

Speziell für den Abbau von Rhamnogalacturonan wurden bisher 23 Enzyme, die abbauend auf Rhamnogalacturonan I einwirken, charakterisiert und in der CAZy-Datenbank registriert. Die sieben derzeit in der CAZy-Datenbank registrierten Hydrolasen gehören alle zur GH28-Familie und stammen aus Pilzen der Gattung *Aspergillus*: *A. aculeatus*, *A. niger* und *A. nidulans*. In der CAZy-Datenbank sind nur zwei Rhamnogalacturonan I exo-Hydrolasen aufgeführt. Beide Enzyme wurden in *A. niger* identifiziert. Neben den charakterisierten Hydrolasen wurde lediglich eine Rhamnogalacturonan-Lyase in *Aspergillus* identifiziert (Vries & Visser 2001). Zur Abspaltung der Veresterungen stehen *A. niger* außerdem fünf Esterasen (CE Familie) zur Verfügung (Benoit et al. 2012).

Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln

Ein großer Teil der Forschung zur Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln zielt auf die reine Verflüssigung der Biomasse zur weiteren Verwendung als Substrat in biotechnologischen Prozessen ab. Daher gibt es oft nur Angaben zur Gesamtzuckerausbeute, welche normalerweise bei einem Einsatz von bis zu 100 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel zwischen 70 % bis 100 % liegt (Berlowska et al. 2018b; Concha Olmos & Zúñiga Hansen 2012; Micard et al. 1996). Aufgrund des Interesses an der Biotransformation der Monomere D-Galacturonsäure und Arabinose gibt es auch spezifische Daten zu deren Ausbeute. Dabei ist es gelungen, Ausbeuten von rund 80 % D-Galacturonsäure und 70-80 % Arabinose nach der Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln zu erreichen (Leijdekkers et al. 2013; Micard et al. 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration in einem Bereich von 5-35 % zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität der Hydrolyasen führt, wohingegen die Aktivität der Lyasen weniger beeinflusst wird (Li et al. 2021). Um negative Effekte bei der Hydrolyse mit hohen Substratkonzentrationen zu umgehen, konnte gezeigt werden, dass durch eine sequenzielle Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel die Hydrolyseausbeute um 22 % gesteigert werden kann (Marzo et al. 2021).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der enzymatischen Hydrolyse ist die optimale Zusammensetzung des Enzymgemischs, damit das gesamte synergistische Potenzial der Enzyme ausgeschöpft werden kann. Semenova et al. (2019) konnte hierzu zeigen, dass durch optimale Kombination enzymatischer Aktivitäten die Ausbeute an reduzierenden Zucker und Monosacchariden um das 1,2- bis 1,4- fache gesteigert werden kann.

In der Literatur wird eine Vielzahl an Vorbehandlungsmethoden beschrieben, die die Hydrolyseeffizienz erhöhen können (Kracher et al. 2014; Kühnel et al. 2011; Li et al. 2020; Zheng et al. 2013). Dabei ist es wichtig anzumerken, dass es sich dabei um eine zweite Vorbehandlung handelt, da die Zuckerrübenpressschnitzel während der Zuckerextraktion schon ihre erste thermische Vorbehandlung erhalten. Zu den in der Literatur beschriebenen Vorbehandlungsmethoden zählen der Dampfdruckaufschluss, die Extraktion mit Wasser bei bis zu $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Behandlung der Zuckerrübenpressschnitzel mit Säure oder Base. Bei Einsatz einer Vorbehandlung muss durch die Labilität des gewünschten Produkts D-Galacturonsäure sowie der Arabinose bei hohen Temperaturen und saurem pH mit Ausbeuteverlusten und Entstehung von zumeist unerwünschten Nebenprodukten gerechnet werden (Kühnel et al. 2011).

Zur Charakterisierung der Hydrolyse im Satzverfahren wird meist die Ausbeute und die Raum-Zeit-Ausbeute (volumetrische Produktivität) gewählt. Dies ermöglicht den Vergleich verschiedener Hydrolyseprozesse in unterschiedlichen Maßstäben, Reaktorkonstruktionen und Prozessvarianten.

Ausbeute Y zum Zeitpunkt t:

$$Y(t) = \frac{c_p}{c_{\max}} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 3.13}$$

- Mit
- Y(t) Ausbeute zum Zeitpunkt t, %
 - c_p Freigesetzte Produktkonzentration zum Zeitpunkt t, g L⁻¹
 - c_{\max} Maximal mögliche Produktkonzentration, g L⁻¹

Raum-Zeit-Ausbeute, kurz: RZA (volumetrische Produktivität):

$$RZA = \frac{m_p}{V_R \cdot \Delta t} = \frac{c_p}{\Delta t} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

- Mit
- m_p Masse Produkt, g
 - Δt Zeitintervall, h
 - V_R Reaktionsvolumen, L
 - c_p Produktkonzentration, g L⁻¹

4. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien ist in den Tabellen 10.1.1 bis 10.1.6 im Anhang zu finden.

4.1 Mikroorganismus

Als Produktionsorganismus für alle mikrobiellen Prozesse diente der Pilz *Aspergillus niger*. Für eine initiale Stammauswahl wurden die *A. niger* Stämme ATCC 1015, ATCC 11414, NRRL 3122, NRRL 3, N402 und CBS 513.88 untersucht. Der Stamm ATCC 11414 wurde für weitere Parameterstudien zur Verbesserung des Produktionsprozesses ausgewählt. Aus dem Basisstamm ATCC 11414 wurde der Stamm aKS039 abgeleitet, um genetische Modifikationen in diesem Stamm zu ermöglichen. Die weiteren genetisch optimierten Stämme aKS055, aKS056, aKS057, aKS058 sowie aKS090 basieren auf dem zuvor genannten Stamm aKS039. Alle verwendeten Stämme wurden von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft der TU München bereitgestellt. In Tabelle 4.1.1 und Tabelle 4.1.2 sind alle *A. niger* Stämme sowie ihre wichtigsten Eigenschaften zusammengefasst.

Tabelle 4.1.1: Verwendete *A. niger* Basisstämme und deren Eigenschaften.

Stamm	Eigenschaften
NRRL 3 (ATCC 9029, CBS 120.49)	Laborstamm zur Untersuchung von <i>A. niger</i> Parentaler Stamm zu N402
N402	Laborstamm zur Untersuchung von <i>A. niger</i> Durch UV-Mutation aus NRRL 3 erzeugt
ATCC 1015 (NRRL 328, CBS 113.46)	Erhöhte Citronensäure-Produktion Parentaler Stamm zu ATCC11414
ATCC 11414	Erhöhte Citronensäure-Produktion
NRRL 3122 (ATCC 22343, CBS 115989)	Erhöhte Proteinproduktion und Sekretion (Glucoamylase) Parentaler Stamm zu CBS 513.88
CBS 513.88	Erhöhte Proteinproduktion und Sekretion (Glucoamylase) Durch UV-Mutation aus NRRL 3122 erzeugt

Tabelle 4.1.2: Von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft bereitgestellte, rekombinante *A. niger* Stämme und deren Eigenschaften.

Stamm	Genetische Besonderheit	Angestrebte Eigenschaften
aKS039	<i>kusA::amdS::kusA</i> , <i>ΔpyrG</i> , <i>ΔnicB</i>	Uridin- und Nicotinamid-Auxotrophie durch Deletion der Uridinmonophosphat und Nicotinamid-Biosynthese Basisstamm der Stämme aKS055-058 und aKS090
aKS055	<i>ΔgaaX</i>	Konstitutive Aktivierung der Pektinase-Produktion durch deletierten Repressor GaaX
aKS056	<i>ΔracA</i>	Vergrößerung der Sekretionskapazität durch gesteigerte Hyphen-Verzweigung
aKS057	<i>ΔcreA</i>	Deletierte Katabolitrepression durch Monosaccharide
aKS058	<i>ΔprtT</i>	Verringerte Protease-Produktion durch Deletion eines positiven Protease-Transkriptionsfaktors
aKS090	<i>ΔgaaX</i> , <i>ΔgaaA</i> , <i>Δgar1</i>	Konstitutive Aktivierung der Pektinase-Produktion durch deletierten Repressor GaaX, Verringerte Metabolisierung von D-Galacturonsäure durch Deletion zwei funktional orthologer D-GalA-Reduktasen

4.2 Reaktionsmedien, Substrate und Puffer

4.2.1 Vorkulturmedium

Für die Anzucht von *A. niger* Sporen wurde ein Kartoffelextrakt-Glucose-Agar mit 1 % Hefeextrakt und 1 % Spurenelementlösung verwendet (kurz: PDAYET, vgl. Tabelle 4.2.1). Hierzu wurde der Kartoffelextrakt-Glucose-Agar und das Hefeextrakt, wie in Tabelle 4.2.1 angegeben, in vollentsalztem (VE) Wasser gelöst und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde die zuvor als Stammlösung angesetzt und sterilisierte Spurenelementlösung (vgl. Tabelle 4.2.2) unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Bei der Vorkultur der rekombinanten *A. niger* Stämme aKS039 bis aKS090 (vgl. Tabelle 4.1.2) wurde zusätzlich Uridin aus einer sterilen Stammlösung ebenfalls unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Abschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Durchmesser = 10 cm) gegossen und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.2.1: Zusammensetzung des PDAYET-Mediums zur Vorkulturherstellung.

Chemikalie	Konzentration	
Kartoffelextrakt-Glucose-Agar	39	g L ⁻¹
Hefeextrakt	10	g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1	mL L ⁻¹
Uridin*	1	mmol L ⁻¹

*Zugabe von Uridin nur zur Anzucht rekombinanter *A. niger* Stämme notwendig.

4.2.2 Spurenelementlösung

Als Zusatz für das Vorkultur-, Hauptkultur- und Hydrolysemedium wurde eine Spurenelementlösung nach Vishniac & Santer (1957) verwendet. Dazu wurden die in Tabelle 4.2.2 aufgelisteten Komponenten für die Herstellung einer 1000x konzentrierten Stammlösung in vollentsalztem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH mit 2 M HCl auf pH 4 eingestellt und die Lösung für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Bis zur Verwendung wurde die Spurenelementlösung bei 4°C gelagert. Ein Farbumschlag (grün nach lila) ist innerhalb der ersten zwei Wochen nach Herstellung normal.

Tabelle 4.2.2: Zusammensetzung der 1000x Spurenelementlösung nach (Vishniac & Santer 1957).

Chemikalie		Konzentration, g L ⁻¹
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	10
Zink (II)-sulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	4,4
Mangan (II)-chlorid Tetrahydrat	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,01
Cobalt (II)-chlorid Hexahydrat	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,32
Kupfer (II)-sulfat Pentahydrat	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,315
Ammoniumheptamolybdat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,22
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,47
Eisen (II)-sulfat Heptahydrat	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1

4.2.3 Sporenlösung (NaCl-Tween)

Zur Sporenernte und Verdünnung der Sporenlösung wurde eine 8,9 % (w/v) Natriumchlorid und 0,05 % (v/v) Tween-80 Lösung verwendet. Die Komponenten wurden wie in Tabelle 4.2.3 aufgelistet in vollentsalztem Wasser gelöst und für 10 min bei 121°C sterilisiert. Bis zur Verwendung wurde die Sporenlösung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.2.3: Zusammensetzung der Sporenlösung (NaCl-Tween).

Chemikalie	Konzentration	
Natriumchlorid	8,9	g L ⁻¹
Tween-80	500	µL L ⁻¹

4.2.4 Analysepuffer (Natriumcitrat-Puffer)

Als Pufferlösung für die angewendeten Enzymaktivitätsuntersuchungen wurde ein 100mM Natriumcitrat Puffer pH 4,5 verwendet. Zur Einstellung des pH wurde eine 100 mM Natriumcitrat-Lösung mit einer 100 mM Citronensäure-Lösungen titriert und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Bis zur Verwendung wurde der Puffer bei 4 °C gelagert.

4.2.5 Zuckerrübenpressschnitzel (pektinreiche Reststoffe)

Während der Enzymproduktion mit *A. niger* und der enzymatischen Hydrolyse von pektinreichen Agrarreststoffen wurden von der Südzucker AG (Mannheim, Deutschland) bereitgestellte, gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel (nachfolgend in der Arbeit kurz: Zuckerrübenschnitzel) verwendet. Das Substrat wurden getrocknet und gemahlen in Eimer mit der Aufschrift 26.03.2018 Rübenpressschnitzel (201720217) geliefert. Das Substrat wurden bis zu seiner Verwendung bei 4°C gelagert und vor der Einwaage für die Untersuchungen für mindestens 48 h bei 50 °C getrocknet.

Um Kenntnis über die genaue Partikelgrößenverteilung des Substrats zu erlangen, wurde eine repräsentative Siebanalyse zur Bestimmung der Partikelgröße durchgeführt. Hierzu wurden 15 g des getrockneten Substrats im Triplikat für 30 Sekunden über vier Siebe mit den Maschenweiten von 2,5 mm, 2 mm, 1 mm und 0,5 mm gesiebt. Zur Auswertung wurden Mittelwert und Standardabweichung der ausgewogenen Einzelfractionen berechnet. Die Partikelgrößenverteilung der getrockneten Zuckerrübenschnitzel ist Tabelle 4.2.4 zu entnehmen.

Tabelle 4.2.4: Siebanalyse zur Bestimmung der Partikelgröße von Zuckerrübenschnitzeln.

Partikelgröße x, mm	Fraktioneller Anteil, %	Standardabweichung, %
1,0 < x < 2,0	8,28	9,61
0,5 < x < 1,0	57,22	5,52
x < 0,5	34,55	11,22

4.2.6 Medium zur Kultivierung von *A. niger* im Rührkesselreaktor

Halb-definiertes Referenzmedium

Als Referenzmedium wurde ein Minimalmedium mit Zitruspektin als Kohlenstoffquelle verwendet. Alle weiteren Bestandteile wurden als Stammlösungen vorbereitet und unter sterilen Bedingungen zu einem Medium vereinigt (Tabelle 4.2.5). Die Stammlösungen der Stickstoffquelle Natriumnitrat (3,5 M, pH 5,5), der beiden Salze Kaliumchlorid (350 mM, pH 5,5) und Kaliumhydrogenphosphat (550 mM, pH 5,5), des Magnesiumsulfat (1M), des Antischaummittel PPG P2000 (10 % (V V⁻¹)) und der Spurenelementlösung (1000x, vgl. Tabelle 4.2.2) wurden separat mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) hergestellt, falls nötig mit Kaliumhydroxid und Schwefelsäure titriert und bei 121°C für 20 min sterilisiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Stammlösungen bei Raumtemperatur gelagert. Die Kohlenstoffquelle Zitruspektin wurde für jede Untersuchung frisch in einem Messkolben eingewogen, in VE-Wasser gelöst und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nach Sterilisation wurde der Messzylinder mit sterilem VE-Wasser bis auf die Eichmarke aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen vervollständigt und in den zuvor sterilisierten Rührkesselreaktor transferiert.

Tabelle 4.2.5: Zusammensetzung des halb-definierten Referenzmediums zur Kultivierung von *A. niger*.

Komponente		Finale Konzentration	
Kohlenstoffquelle	Zitruspektin	20	g L ⁻¹
Stickstoffquelle	Natriumnitrat	NaNO ₃	70 mM (6 g L ⁻¹)
Salze	Kaliumchlorid	KCl	7 mM (0,5 g L ⁻¹)
	Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	11 mM (1,5 g L ⁻¹)
	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	2 mM (0,5 g L ⁻¹)
Spurenelementlösung (1000x)		1	mL L ⁻¹
Antischaummittel	Polypropylenglycol P2000	1	mL L ⁻¹

Komplexmedium mit pektinreichen Reststoffen

Als Hauptkulturmedium wurde hauptsächlich ein Komplexmedium mit Zuckerrübenschnitzeln als pektinreiche Kohlenstoffquelle verwendet. Alle Bestandteile außer der Kohlenstoffquelle wurden als Stammlösungen vorbereitet und unter sterilen Bedingungen zu einem Medium vereinigt (Tabelle 4.2.6). Die Stammlösungen der Stickstoffquelle Ammoniumsulfat (2,2 M, pH 5,5), der beiden Salze Kaliumchlorid (350 mM, pH 5,5) und Kaliumhydrogenphosphat (550 mM, pH 5,5), des Magnesiumsulfat (1M), des Antischaummittel PPG P2000 (20 % (V V⁻¹)) und der Spurenelementlösung (1000x, vgl. Tabelle 4.2.2) wurden separat mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) hergestellt, falls nötig mit Kaliumhydroxid oder Schwefelsäure titriert und bei 121°C für 20 min sterilisiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Stammlösungen bei Raumtemperatur gelagert. Die Kohlenstoffquelle wurde für jede Untersuchung frisch in einem Messkolben eingewogen, in VE-Wasser suspendiert und in den zur Sterilisation vorbereiteten Rührkesselreaktor überführt. Nach Sterilisation des Rührkesselreaktors für 20 min bei 121 °C, wurde das Restmedium unter sterilen Bedingungen vervollständigt und in den Rührkesselreaktor transferiert.

Während dieser Forschungsarbeiten wurden Parameterstudien zur Medienzusammensetzung durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Kohlenstoffquelle und verschiedene Stickstoffquellen und deren Konzentration untersucht. Die Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 4.2.6 und Tabelle 4.2.7 aufgeführt.

Tabelle 4.2.6: Zusammensetzung des Komplexmediums zur Kultivierung von *A. niger*.

Komponente		Finale Konzentration		
Kohlenstoffquelle	Zuckerrübenschnitzel	30*	g L ⁻¹	
Stickstoffquelle	(siehe Tabelle 4.2.7)			
Salze	Kaliumchlorid	KCl	7	mM (0,5 g L ⁻¹)
	Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	11	mM (1,5 g L ⁻¹)
	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	2	mM (0,5 g L ⁻¹)
Spurenelementlösung (1000x)		1	mL L ⁻¹	
Antischaummittel	Polypropylenglycol P2000	1	mL L ⁻¹	
Uridin**		1	mmol L ⁻¹	

*Falls nicht explizit beschrieben, wurden immer 30 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel verwendet.

**Zugabe von Uridin nur zur Anzucht rekombinanter *A. niger* Stämme notwendig.

Tabelle 4.2.7: Typ und Konzentration der zum Komplexmedium hinzugefügten Stickstoffquelle.

Komponente		Finale Konzentration	
Natriumnitrat (1x)	NaNO ₃	70	mM (6 g L ⁻¹)
Natriumnitrat (5x)		350	mM (30 g L ⁻¹)
Ammoniumsulfat (1x)	(NH ₄) ₂ SO ₄	35	mM (4,6 g L ⁻¹)
Ammoniumsulfat (5x)		175	mM (23 g L ⁻¹)
Urea (Harnstoff) (5x)	CH ₄ N ₂ O	175	mM (10,5 g L ⁻¹)
Ammoniumdihydrogenphosphat (5x)	(NH ₄)H ₂ PO ₄	350	mM (40,3 g L ⁻¹)
Ammoniumchlorid (5x)	NH ₄ CL	350	mM (18,7 g L ⁻¹)

4.2.7 Medium zur Hydrolyse pektinreicher Reststoffe

Hydrolysemedium im mL-Maßstab

Zur Hydrolyse im mL-Maßstab wurde ein gepuffertes Medium mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat verwendet. Alle Bestandteile außer der Kohlenstoffquelle wurden als Stammlösungen vorbereitet und unter sterilen Bedingungen zu einem Medium vereinigt (Tabelle 4.2.8). Die Pufferlösungen 1000 mM, 150 mM und 50 mM Natriumacetat und Kaliumcitrat wurden separat mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) hergestellt, auf pH 4,5 eingestellt und bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Pufferlösungen bei Raumtemperatur gelagert. Zur Verhinderung von Fremdkeimwachstum wurde eine 50 g L⁻¹ Kanamycin Stamm-lösung in VE-Wasser hergestellt, anschließend sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Die zuvor hergestellte Enzymmischung wurde aufgetaut, sterilfiltriert und auf Eis gelagert bis sie dem Hydrolysemedium hinzugefügt wurde.

Das vorgetrocknete Substrat wurde für jede Untersuchung frisch in einem Messkolben eingewogen, in Pufferlösung mit gewünschter Molarität (pH 4,5) suspendiert und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen auf Eis vervollständigt, in die verwendeten Einwegreaktoren aliquotiert und zum Start der Hydrolyse in den verwendeten Reaktorblock (vgl. Kapitel 4.4.1) transferiert.

Tabelle 4.2.8: Zusammensetzung des gepufferten Hydrolysemedium im mL-Maßstab.

Komponente		Finale Konzentration	
Substrat	Zuckerrübenschnitzel	50	g L ⁻¹
Enzymmischung	Benötigte Menge wurde anhand der Aktivitätsbestimmung berechnet	100	U g _{Substrat} ⁻¹
Puffer	Natriumacetat oder Kaliumcitrat	1000, 50 und 150	mM
Antibiotikum	Kanamycin	50	mg L ⁻¹

Hydrolysemedium im L-Maßstab

Aufgrund der Möglichkeit einer pH Kontrolle und vor dem Hintergrund einer Prozessintegration von Enzymproduktion und Hydrolyse wurde im L-Maßstab das nicht gepufferte Komplexmedium (Kapitel 4.2.6) verwendet. Alle Bestandteile außer der Kohlenstoffquelle wurden als Stammlösungen vorbereitet und unter sterilen Bedingungen, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, zu einem Grundmedium vereinigt (Tabelle 4.2.6). Als Substrat wurde 50 g L^{-1} und 75 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel verwendet. Das Substrat wurde im Reaktor in VE-Wasser suspendiert und bei 121 °C für 20 min sterilisiert.

Zur Verhinderung von Fremdkeimwachstum wurde eine 50 g L^{-1} Kanamycin Stammlösung in VE-Wasser hergestellt, anschließend sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Die zuvor hergestellte Enzymmischung wurde aufgetaut, sterilfiltriert und auf Eis gelagert. Anschließend wurde dem Grundmedium Kanamycin (50 mg L^{-1}) und die hergestellte Enzymmischung ($250 \text{ U g}_{\text{Substrat}}^{-1}$ und $500 \text{ U g}_{\text{Substrat}}^{-1}$) aseptisch hinzugefügt und zum Start der Hydrolyse in den Rührkesselreaktor transferiert (vgl. Kapitel 4.4).

4.3 Kultivierung von *A. niger*

4.3.1 Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung der *A. niger* Stämme erfolgte in Form einer Glyceringefrierkultur der Pilzsporen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hierfür wurden neu am Lehrstuhl angekommene Sporen des jeweiligen Stammes unter sterilen Bedingungen auf spezielle Kartoffel-Dextrose-Agarplatten (vgl. Tabelle 4.2.1) transferiert und für 5 Tage bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Brutschrank (Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland) unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Präparation der Glyceringefrierkultur wurden die Sporen mit einem sterilen Einwegspatel in 10 mL steriler NaCl-Tween Lösung (vgl. Tabelle 4.2.3) aufgenommen, über einen sterilen Wattefilter filtriert, für 10 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Sporen in 10 mL frischer NaCl-Tween Lösung suspendiert. Für die Lagerung wurde die Sporenlösung mit 30 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Um den Einfluss der Sporenanzucht und -generation zu minimieren, wurden zwei der erstmalig hergestellten Glyceringefrierkulturen (1. Generation) explizit zur Stammhaltung zurückgestellt, um immer Sporen der 1. Generation zur Herstellung weiterer Glyceringefrierkulturen zur Verfügung zu haben. Durch diese Stammhaltung wurden zur Vorkulturherstellung ausschließlich Glyceringefrierkulturen der 2. Generation eines jeweiligen Stammes verwendet.

4.3.2 Vorkulturherstellung

Für jede *A. niger* Kultivierung wurde eine Vorkultur angezogen und für die Inokulation präpariert. Hierzu wurden im ersten Schritt $15\text{ }\mu\text{L}$ einer Glyceringefrierkultur des jeweiligen Stammes unter sterilen Bedingungen auf spezielle Kartoffel-Dextrose-Agarplatten (vgl. Tabelle 4.2.1) transferiert und für 5 Tage bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Brutschrank (Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland) unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Präparation des Inokulums wurden die Sporen vor Kultivierungsstart mit einem sterilen Einwegspatel in 10 mL steriler NaCl-Tween Lösung (vgl. Tabelle 4.2.3) geerntet, über einen sterilen Wattefilter filtriert und für 10 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Sporen in frische NaCl-Tween Lösung suspendiert. Um die hergestellte Sporenlösung für die Inokulation weiter zu präparieren, wurde die Extinktion verschiedener Verdünnungen (1:8, 1:16, 1:32, 1:64) bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite[®] M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Daraus konnte mit Hilfe einer zuvor angefertigten Korrelation zwischen OD_{600} und Sporenkonzentration die tatsächliche Sporenkonzentration berechnet werden. Für die Korrelation der Sporenkonzentration wurden verschiedene Verdünnungen einer Sporenlösung mittels einer Thoma-Zählkammer ausgezählt und deren OD_{600} gemessen. Zur abschließenden Präparation wurde das Inokulum mit einer NaCl-Tween Lösung auf

eine Sporenkonzentration von 1×10^{11} Sporen L^{-1} verdünnt, das benötigte Volumen auf eine sterile Spritze aufgezogen und bis zur Inokulation bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.3.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung von *A. niger* im Schüttelkolben wurde in 25 mL Pektin-Minimalmedium (pH 4,5, 20 g L^{-1} Pektin C) in 250 mL Schüttelkolben für 96 h bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 min^{-1} (25 mm Exzentrizität) durchgeführt. Das Medium wurde mit 10^9 Sporen L^{-1} beimpft. Alle Prozesse im Schüttelkolben wurden im Triplikat durchgeführt und statistisch mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test ausgewertet. Dazu wurde die Software Origin (OriginLab Cooperation, Northampton, USA) mit einem Signifikanzniveau von 5 % verwendet.

4.3.4 Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab

Kultivierungen im Satzbetrieb zur Charakterisierung der Produktion pektinolytischer Enzyme von *A. niger* erfolgten in zwei verschiedenen Rührkesselreaktoren. Zum einen wurde ein Rührkesselreaktor vom Typ Labfors 5 der Firma Infors AG im 7,5 L-Maßstab und zum anderen die vierfach parallelisierten Rührkesselreaktoren vom Typ DASGIP der Firma Eppendorf SE mit einem Totalvolumen von 1,5 L pro Reaktor verwendet.

7,5 L-Maßstab

Für die Satzkultivierungen im 7,5 L-Maßstab wurde ein Glasreaktor (Typ Labfors 5, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 3 und 4 L verwendet. Die einzelnen Komponenten der Anlage sind im Anhang in Tabelle 9.1.4 aufgelistet und in Abb. 4.3.1 näher dargestellt. Der Glasreaktor (Durchmesser = 15 cm, Höhe = 46,5 cm) verfügte über ein Doppelmantel, mit dem die Reaktionstemperatur während der Prozesse kontrolliert werden konnte. Über die Deckelplatte wurden Rührermotor, Gelöstsauerstoff- und pH Sonde, Tauchrohr zum Einbau eines Temperaturfühlers, Abluftkühler zur Minimierung des Verdunstungsverlust, Begasungsrohr, Probenahmerohr und Titrationsmittelpport eingebaut. Zur besseren Durchmischung des Reaktors wurden drei Strömungsbrecher an der Innenseite der Deckelplatte befestigt. Der Rührermotor konnte an eine Kupplung angeschlossen werden, an der, über eine Gleitringdichtung, die Rührwelle befestigt war. An dieser Rührwelle waren zur Bewältigung der gewünschten Rühraufgabe drei Sechsblasscheibenrührer (Durchmesser 5,4 und Blatthöhe 1,1 cm) befestigt. Dabei war zwischen dem unteren und mittleren Rührer 2,5 cm und zwischen dem mittleren und oberen Rührer 5,0 cm Abstand. In Kapitel 5.5 wurde erstmals mit einer alternativen Rührerkonfiguration gearbeitet, bei dem auch Schrägblattrührer zum Einsatz kamen. Bei dieser Konfiguration war zwischen dem Sechsblasscheibenrührer unten und dem mittleren, Schrägblattrührer 5,0 cm Abstand. Zwischen dem mittleren Rührer und dem oberen

Schrägblattrührer war ein Abstand von 7,5 cm. Aufgrund des Kopfraumvolumens und der nicht schaubildenden Eigenschaften der verwendeten Reaktionsmedien, konnte auf den Einbau einer Schaumsonde verzichtet werden. Zur Analyse der Abluft, wurde eine Abgassensorik (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland), an die sterilfiltrierte Abluft angeschlossen. Die Begasung erfolgte mit auf 2,5 bar geregelter, sterilfiltrierter Druckluft, deren Volumenstrom über einen, in der Steuereinheit integrierten, Massendurchflussregler eingestellt werden konnte. Die Prozesse wurden ausschließlich drucklos durchgeführt. Zur Steuerung und Regelung der Prozessgrößen, wurde die am Reaktor befindliche Steuereinheit oder die Software eve® (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) verwendet.

Zur Vorbereitung eines Prozesses wurde die pH-Sonde auf pH 4,0 und pH 7,0 kalibriert (Zweipunktkalibrierung). Anschließend wurde das Substrat Zitruspektin oder Zuckerrübenschnitzel in 2 L VE-Wasser zusammen mit dem Antischaummittel Polypropylenglycol (PPG) in den vorbereiteten Reaktor gegeben und für 20 min bei 121 °C im Autoklav sterilisiert. Die restlichen Medienbestandteile (Kapitel 4.2.6) wurden, nach Anschluss des Reaktors an die Station, steril über eine peristaltische Schlauchpumpe in den Reaktor transferiert. Die Kalibrierung der Gelöstsauerstoffsonde auf 100 % fand bei 30 °C, einer Begasung von 2 vvm und bei der im Prozess verwendeten Rührerdrehzahl statt. Eine Kalibrierung auf 0 % mit Stickstoff war aufgrund des Sondentyps (digital, optisch) nicht nötig. Währenddessen wurde die Einpunktkalibrierung der Abgasanalytik mittels Druckluft auf 20,95 % Sauerstoff und 0,04 % Kohlenstoffdioxid durchgeführt.

Anschließend wurden die Startvariablen eingestellt ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2$ vvm, pH 4,5) und der Prozess durch Inokulation mit der gewünschten Sporenkonzentration (Standard: 10^9 Sporen L^{-1}) gestartet. Während des Prozesses wurde der pH durch automatische Zugabe von 1 M H_2SO_4 und 3 M KOH kontant auf pH 4,5 gehalten. Auch die Temperatur wurde konstant bei 30 °C gehalten. Zur Minimierung eines Sporenverlust zu Beginn des Prozesses wurde ein zweistufiges Protokoll der Rührerdrehzahl und Begasungsrate eingesetzt (adaptiert aus Nitsche et al. 2012). Erst nach den ersten drei oder sechs Stunden, in denen die Rührerdrehzahl auf 300 min^{-1} und die Begasungen passiv durch den Kopfraum des Reaktors realisiert wurde, wurden beide Variablen auf ihre gewünschte Betriebswerte eingestellt. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung des Pilzes wurde eine Kaskade basierend auf Erhöhung der Begasungsrate (0,2 bis 2 vvm) verwendet, durch die die Gelöstsauerstoffkonzentration immer über 30% Luftsättigung gehalten werden sollte. Von einer Erhöhung der Drehzahl wurde aufgrund der dadurch induzierten Morphologieeffekte des Produktionsorganismus und damit einhergehenden Prozessveränderungen abgesehen. Bis zum Ende des Prozesses wurden die Kultivierungsvariablen über ein Prozessskript in der oben genannten Software eve® aufgezeichnet und gesteuert.

Nach Ende des Prozesses wurde das Kultivierungsmedium für 1 h bei 14.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Hettich), der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 11 μm und 2.5 μm) und anschließend in sogenannten Whirlpacks bei -80 °C eingefroren und bei -20 °C gelagert.

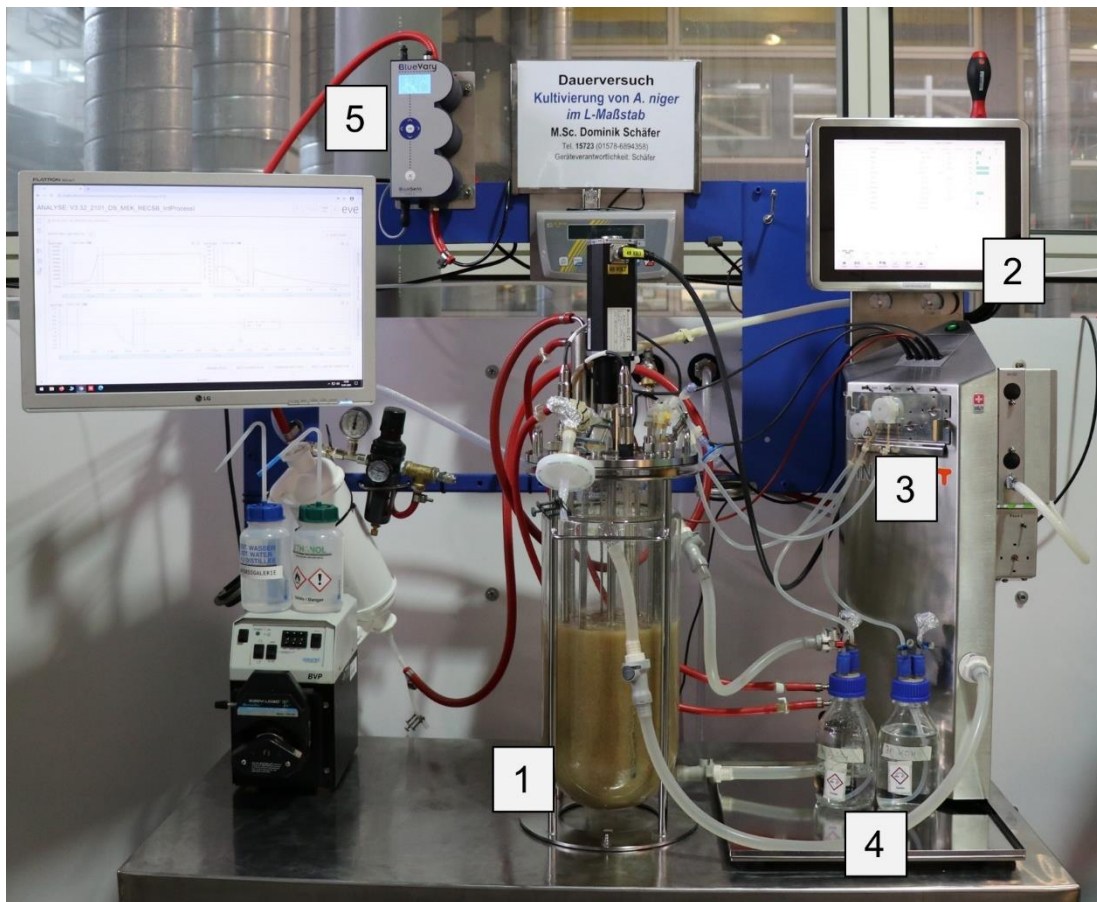


Abb. 4.3.1: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 7,5 L-Maßstab. 1: 7 L-Rührkesselreaktor, 2: Kontrolleinheit, 3: Pumpenmodul, 4: Titrationsmittel, 5: Abgasgasanalyseeinheit.

1,5 L-Maßstab

Für die Satzkultivierungen im 1,5 L-Maßstab wurden parallelisierte Rührkesselreaktoren (Typ DASGIP, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) mit vier identischen Glasreaktoren (Durchmesser = 11 cm, Höhe = 200 cm) mit einem Arbeitsvolumen von 0,7 L verwendet. Die einzelnen Komponenten der Anlage sind im Anhang in Tabelle 9.1.3 aufgelistet und in Abb. 4.3.2 näher dargestellt. Die einwandigen Glasreaktoren wurden mittels eines Heiz-/Kühlblocks, in den sie eingesetzt wurden, temperiert. Über die Deckelplatte wurden Rührermotor, Gelöstsauerstoff- und pH Sonde, Tauchrohr zum Einbau eines Temperaturfühlers, Abluftkühler zur Minimierung des Verdunstungsverlust, Begasungsrohr, Probenahmerohr und Titrationsmittelport eingebaut. Die Glasreaktoren verfügen über keine Strömungsbrecher. An der Rührwelle waren zur Bewältigung der gewünschten Rühraufgabe zwei Sechsblasscheibenrührer (Durchmesser 4,6 cm und Blatthöhe 1,1 cm) befestigt. Dabei war zwischen dem unteren und oberen

Rührer 2,5 cm Abstand. In Kapitel 5.4.4 wurde erstmals mit einer alternativen Rührerkonfiguration gearbeitet, bei dem auch Schrägblattrührer zum Einsatz kamen. Bei dieser Konfiguration war zwischen dem untern Sechsblasscheibenrührer und dem oberen Schrägblattrührer auch 2,5 cm Abstand. Aufgrund der nicht schaubildenden Eigenschaften der verwendeten Reaktionsmedien, konnte auf den Einbau einer Schaumsonde verzichtet werden. Zur Analyse der Abluft wurde eine Abgassensorik (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland) an die sterilfiltrierte Abluft jedes Reaktors angeschlossen. Die Begasung erfolgte mit auf 2,5 bar geregelter, sterilfiltrierter Druckluft, deren Volumenstrom über einen, in der Steuereinheit integrierten, Massendurchflussregler eingestellt werden konnte. Die Prozesse wurden ausschließlich drucklos durchgeführt. Zur Steuerung und Regelung der Prozessgrößen, wurde die am Reaktor befindliche Steuereinheit oder die Software DASware® control (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Zur Vorbereitung eines Prozesses wurde die pH-Sonde auf pH 4,0 und pH 7,0 kalibriert (Zweipunktkalibrierung). Anschließend wurden die Reaktoren mit VE-Wasser gefüllt und bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Nach dem Abkühlen der Reaktoren, wurden das VE-Wasser entfernt und das zuvor sterilisiert und gemischte Medium (Kapitel 4.2.6) unter sterilen Bedingungen über sogenannte „Seitenarme“ in die Reaktoren hinzugegeben. Nach Integration der Reaktoren in das Reaktorsystem wurde die Gelöstsauerstoffsonde auf 100 % kalibriert (30 °C, Begasung von 2 vvm, im Prozess verwendeten Rührerdrehzahl). Eine Kalibrierung auf 0 % mittel Stickstoff war aufgrund des Sondentyps (digital, optisch) nicht nötig. Währenddessen wurde die Einpunktkalibrierung der Abgasanalytik auf 20,95 % Sauerstoff und 0,04 % Kohlenstoffdioxid durchgeführt.

Anschließend wurden die Startvariablen eingestellt ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2$ vvm, pH 4,5) und der Prozess durch Inokulation mit der gewünschten Sporenkonzentration (Standard: 10^9 Sporen L^{-1}) gestartet. Während des Prozesses wurde der pH durch automatische Zugabe von 1 M H_2SO_4 und 3 M KOH kontant auf pH 4,5 gehalten. Auch die Temperatur wurde konstant bei 30 °C gehalten. Zur Minimierung eines Sporenverlustes zu Beginn des Prozesses wurde ein zweistufiges Protokoll der Rührerdrehzahl und Begasungsrate eingesetzt (adaptiert aus Nitsche et al. 2012). Erst nach den ersten drei oder sechs Stunden, in denen die Rührerdrehzahl auf 300 min^{-1} und die Begasungen passiv durch den Kopfraum des Reaktors realisiert wurden, wurden beide Variablen auf ihre gewünschte Betriebswerte eingestellt. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung des Pilzes, wurde eine Kaskade basierend auf Erhöhung der Begasungsrate (0,2-2 vvm) verwendet, durch die die Gelöstsauerstoffkonzentration immer über 30 % Luftsättigung gehalten werden sollte. Von einer Erhöhung der Drehzahl wurde aufgrund der dadurch induzierten Morphologieeffekte des Produktionsorganismus und damit einhergehenden Prozessveränderungen abgesehen. Bis zum Ende des Prozesses wurden die

Kultivierungsvariablen über ein Prozessskript in der oben genannten Software DASware® control aufgezeichnet und gesteuert. Die Daten der Abgasanalytik wurden über ein separates Modul aufgezeichnet.

Nach Ende der Prozesse wurde das Kultivierungsmedium für 1 h bei 14.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Hettich), der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 11 µm und 2.5 µm) und anschließend in sogenannten Whirlpacks bei -80 °C eingefroren und bei -20 °C gelagert.

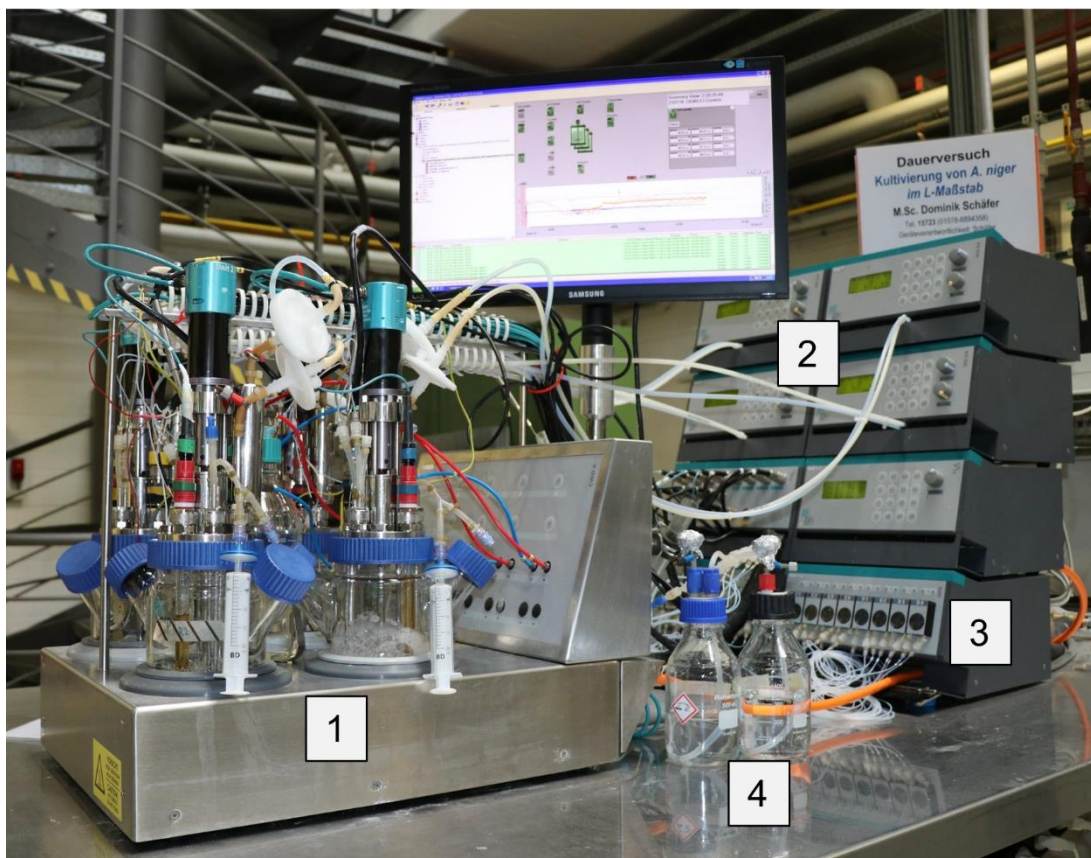


Abb. 4.3.2: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 1,5 L-Maßstab. 1: 1,5 L-Rührkesselreaktor mit Temperatureinheit, 2: Kontrolleinheit, 3: Pumpenmodul, 4: Titrationsmittel. Die verwendete Abgasanalyseeinheit ist auf dem Bild nicht dargestellt.

4.3.5 Untersuchung von Rührerkonfigurationen im Rührkesselreaktor

Um der rheologischen Anforderungen der untersuchten Zuckerrübenschnittzelsuspensionen gerecht zu werden, wurden drei verschiedene Rührerkonfigurationen auf ihr Mischzeitverhalten untersucht. Dabei wurde der in Kapitel 4.3.4 beschriebene Rührkesselreaktor im 7,5 L-Maßstab verwendet. Als Medium wurde ein 70 %ige (v/v) Glycerinlösung (~ 27 mPa s bei 20°C) verwendet. Die Untersuchungen wurden bei 30 °C durchgeführt.

Untersucht wurden die in Tabelle 4.3.1 und Abb. 4.3.3 dargestellten Rührerkonfigurationen. Dabei wurden zwei Rührertypen verwendet: Der Sechsblasscheibenrührer (Rushton-Turbine, radial fördernd) hatte einen Durchmesser von 5,4 cm und eine Blatthöhe/Blattbreite von 1,1 cm. Der Schrägblattrührer (axial fördern mit radial Anteil), welcher aus drei Rührblättern bestand, hatte einen Durchmesser von 6,5 cm, eine Blattlänge von 7,2 cm und eine Höhe von 5,3 cm. Der Neigungswinkel der Rührblätter lag bei 45 °. Die Schrägblattrührer konnte sowohl aufwärtsfördern als auch abwärtsfördern eingebaut werden. Das Verhältnis von Rührerdurchmesser zu Reaktordurchmesser (15 cm) beim Sechsblasscheibenrührer betrug 0,36 und beim Schrägblattrührer 0,43.

Tabelle 4.3.1: Geometrische Daten der Rührerkonfigurationen.

	Rührertyp*	Abstand zwischen den Rührern
Konfiguration A	SR-SR-SR	2,5 cm – 5 cm
Konfiguration B	SR-SBRab-SBRaw	5 cm – 7,5 cm
Konfiguration C	SR-SBRaw-SBRab	5 cm – 7,5 cm

*Rührertyp beginnend vom Ende der Rührwelle: Sechsblasscheibenrührer (SR), Schrägblattrührer aufwärtsfördernd (SBRaw), Schrägblattrührer abwärtsfördernd (SBRab)

Zur Bestimmung der Mischzeit wurde eine pH Änderung (Sprungfunktion) durch Zugabe von 500 μ L 2 M NaOH induziert, deren zeitliche Änderung ab der Zugabe bis zum Erreichen eines konstanten pH für 30 Sekunden (Δ pH \leq 0.2 gleichbedeutend mit 90 % Homogenität) als Mischzeit θ_{90} bestimmt wurde. Die Untersuchungen wurden im Triplikat durchgeführt.

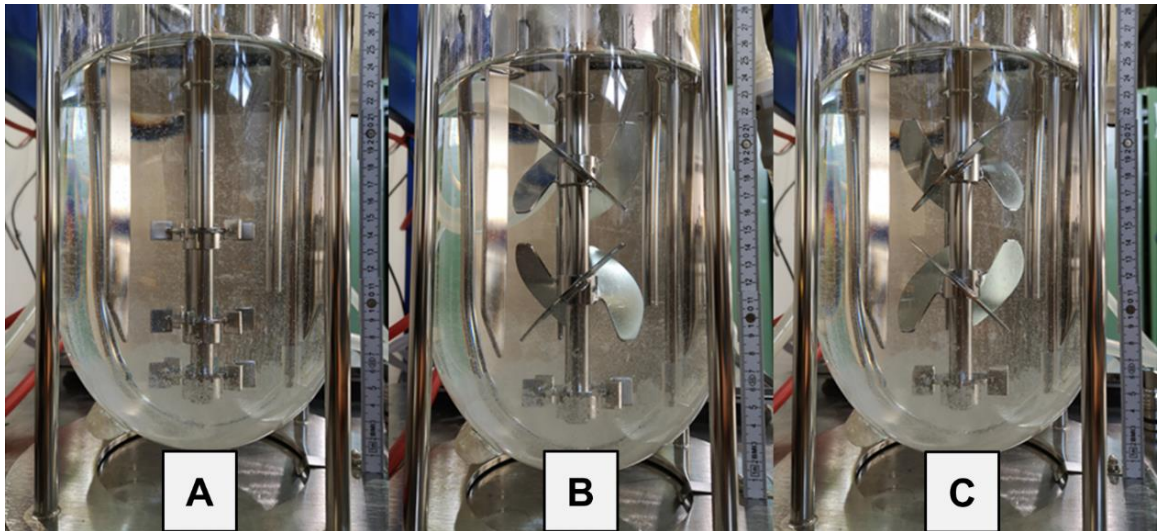


Abb. 4.3.3: Untersuchte Rührerkonfigurationen in 3 L 70 %iger Glycerinlösung. Dargestellt sind die Rührerkonfigurationen (beginnen vom Ende der Rührwelle A: Drei Sechsblasscheibenrührer, B: Sechsblasscheibenrührer - Schrägblattrührer abwärtsfördernd - Schrägblattrührer aufwärtsfördernd, C: Sechsblasscheibenrührer - Schrägblattrührer aufwärtsfördernd - Schrägblattrührer abwärtsfördernd.

4.4 Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübensuspensionen

4.4.1 Enzymatische Hydrolyse im Milliliter-Maßstab

Für die initiale Untersuchung der Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im mL-Maßstab wurde ein parallelisierter Rührkesselreaktorblock der Firma 2mag AG verwendet, bei dem bis zu 48 Rührkesselreaktoren parallel betrieben werden können. Die einzelnen Komponenten der Anlage sind im Anhang in Tabelle 9.1.2 aufgelistet und in Abb. 4.4.2 näher dargestellt.

Es wurde ein Rührkesselreaktorblock verwendet bei dem 48 Positionen für Reaktionsgefäße vorhanden sind, die alle über magnetisch induktiv angetriebene Rührer verfügen (Abb. 4.4.1A). Die Drehzahl der Rührer konnte über eine Steuereinheit eingestellt werden. Die verwendeten S-Rührer waren in der Deckelplatte verankert und wurden speziell am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München entwickelt (Riedlberger et al. 2013; Riedlberger & Weuster-Botz 2012). Als Reaktionsgefäße kamen unbewehrte Einwegreaktoren aus Polystyrol zum Einsatz (Abb. 4.4.1B). Diese steril angelieferten Reaktoren hatten einen Innendurchmesser von 20 mm und eine Gesamthöhe von 86 mm. Das Arbeitsvolumen betrug 12 mL. Zur Temperierung des Rührkesselreaktorblocks wurden zwei unabhängige Wärmetauscher verwendet. Zum einen wurde ein Thermostat zur Temperierung des Reaktionsmediums verwendet und zum anderen wurde ein Kühlaggregat zur Kühlung des Kopfraums verwendet, um Verdunstungsverluste zu minimieren. Eine Probenahme erfolgte über die im Reaktordeckel eingelassenen Probenahmelöcher mittels speziell angefertigter, zuvor sterilisierter Probenahmehohle (Abb. 4.4.1B). Um diese Probenahmelöcher während der Hydrolyse zu verschließen,

wurde eine spezielle Haube konstruiert, welche auf der Innenseite mit thermostabilem Silikon ausgegossen wurde (Abb. 4.4.1A). Während der Probenahme wurde über eine kurzzeitige Begasung (180 L h^{-1}) ein Überdruck in den Reaktoren erzeugt, der eine Kontamination der Reaktoren verhindern sollte.

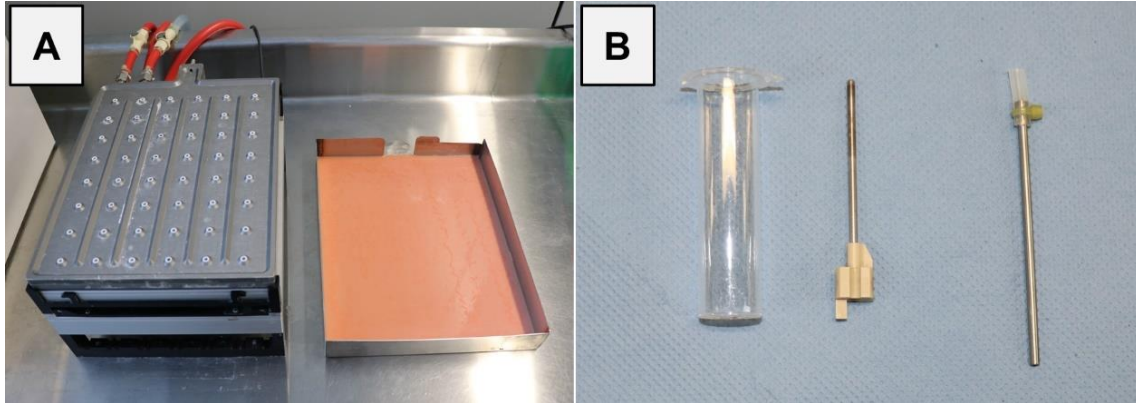


Abb. 4.4.1: 48fach parallel Rührkesselreaktorblock im mL-Maßstab. Dargestellt sind (A) der 48fach parallel Rührkesselreaktorblock der Firma 2mag AG und die am Lehrstuhl konstruierte Haube und (B) die verwendeten unbewehrten Einwegreaktoren, die Rührorgane (S-Rührer) und die Probenahmerohre.

Zur Vorbereitung einer Hydrolyse wurde der Rührkesselreaktorblockdeckel mit Rührer bestückt und zusammen mit der Haube für 20 min bei $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sterilisiert. Das Substrat wurde für jeden Prozess frisch in einem Messkolben eingewogen, in Pufferlösung mit gewünschter Molarität (pH 4,5) suspendiert und für 20 min bei $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sterilisiert. Vor Beginn der Hydrolyse wurden beide Wärmetauscher auf die gewünschte Temperatur temperiert (Thermostat bei 30°C und Kühlaggregat bei 4°C). Anschließend wurde das Medium (vgl. 4.2.7) unter sterilen Bedingungen auf Eis vervollständigt, in die verwendeten Einwegreaktoren aliquotiert und zum Start der Hydrolyse in den verwendeten Reaktorblock transferiert. Die Hydrolyse wurde bei konstanter Temperatur ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 50°C) und Rührerdrehzahl (500 min^{-1}) durchgeführt. Der initiale pH lag bei pH 4,5.

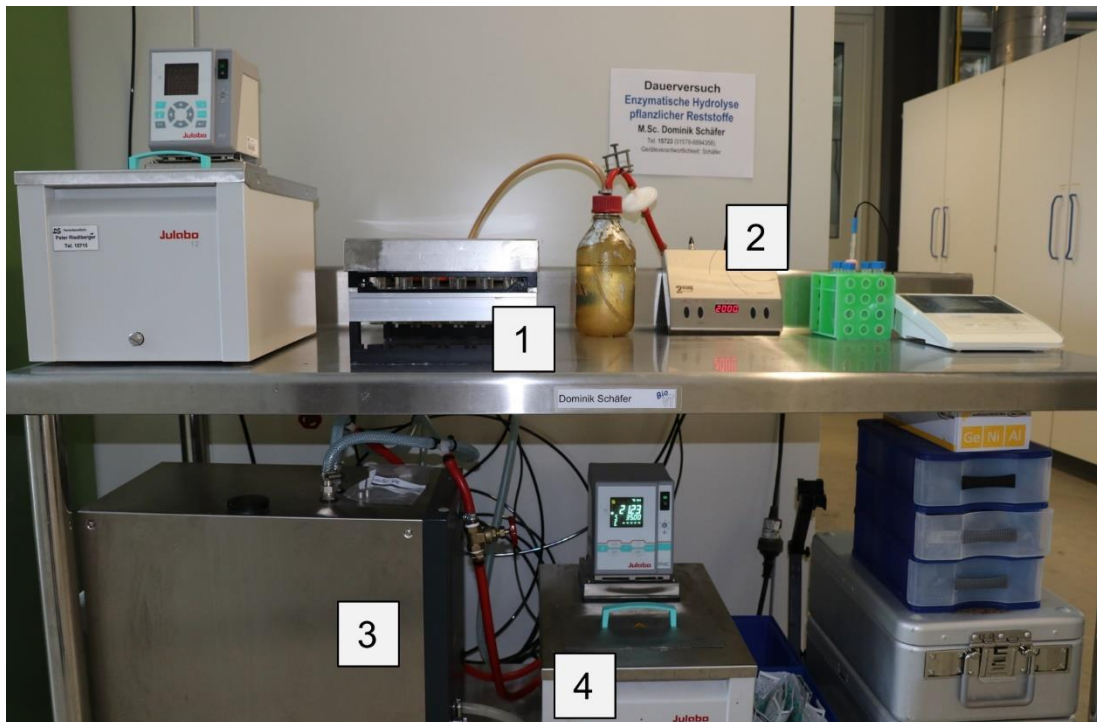


Abb. 4.4.2: Anlagenaufbau Zur Hydrolyse pektinreicher Agrarreststoffe im mL-Maßstab. 1: 48fach parallel Rührkesselreaktorblock der Firma 2mag AG mit Deckel, 2: Steuereinheit zur Kontrolle der Rührergeschwindigkeit, 3: Kühlaggregat zur Kühlung des Kopfraums, 4: Umwälzthermostat zur Temperierung des Reaktorblocks.

4.4.2 Enzymatische Hydrolyse im Liter-Maßstab

Untersuchungen zur Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im Litermaßstab wurden, analog zur Kultivierung von *A. niger*, in den vierfach parallelisierten Rührkesselreaktoren vom Typ DASGIP der Firma Eppendorf SE mit einem Totalvolumen von 1,5 L pro Reaktor durchgeführt.

Zur Untersuchung der Hydrolyse wurden folgende Änderungen zur in Kapitel 4.3.4 beschriebenen Vorgehensweise vorgenommen. Aufgrund der nicht benötigten Begasung des Mediums während der Hydrolyse wurde auf den Einbau der Gelöstsauerstoffsonde und des Abluftkühlers verzichtet. Während der Hydrolyse wurde mit einer alternativen Rührerkonfiguration gearbeitet, bei dem auch Schrägblattrührer zum Einsatz kamen. Bei dieser Konfiguration war zwischen dem Sechsstabscheibenrührer am unteren Ende der Rührwelle und dem oberen Schrägblattrührer 2,5 cm Abstand. Zum Druckausgleich wurden die Reaktoren über einen Sterilfilter passiv belüftet, sodass die Prozesse ausschließlich drucklos durchgeführt werden konnten. Zur Steuerung und Regelung der Prozessgrößen, wurde die am Reaktor befindliche Steuereinheit oder die Software DASware® control (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Zur Vorbereitung der Prozesse wurde die pH-Sonde auf pH 4,0 und pH 7,0 kalibriert (Zweipunktkalibrierung). Anschließend wurden die Reaktoren mit der gewünschten Menge an vortrockneten Zuckerrübenschnitzeln, suspendiert in VE-Wasser, gefüllt und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nach dem Abkühlen der Reaktoren wurden der Suspension das restliche Medium (Kapitel 4.2.7) unter sterilen Bedingungen über die Seitenarme in die Reaktoren hinzugegeben und damit die Hydrolyse gestartet. Anschließend wurden die Kultivierungsvariablen eingestellt ($T = 30^{\circ}\text{C}$, pH 4,5, 600 min^{-1}), welche über die gesamte Hydrolyse konstant gehalten wurden. Während des Satzprozesses wurde der pH durch automatische Zugabe von 1 M H_2SO_4 und 3 M KOH konstant auf pH 4,5 gehalten. Auch die Temperatur wurde konstant bei 30 °C gehalten. Bis zum Ende des Prozesses wurden die Kultivierungsvariablen über die oben genannte Software DASware® control aufgezeichnet und gesteuert.

Nach Ende der Prozesse wurde das Hydrolysemedium für 1 h bei 14.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Hettich), der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 11 μm und 2.5 μm) und anschließend in sogenannten Whirlpacks bei -80 °C eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Abschließende Untersuchungen zur Prozessintegration wurden im Rührkesselreaktor vom Typ Labfors 5 der Firma Infors AG im 7,5 L-Maßstab durchgeführt. Im 7,5 L-Maßstab wurde, wenn nicht explizit in Kapitel 5.5 darauf hingewiesen wurde, exakt nach der Beschreibung in Kapitel 4.3.4 gearbeitet. Allgemeine Eigenschaften der beiden Systeme sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

4.5 Analytische Methoden

Zur Charakterisierung der Prozesse wurden Proben zur Durchführung der unten aufgeführten analytischen Methoden entnommen. Dafür wurde zu bestimmten Zeitpunkten bei der Kultivierung von *A. niger* und bei der Hydrolyse pektinreicher Substrate Kulturmaterial entnommen. Die morphologische Charakterisierung sowie die Bestimmung der Biotrockenmasse fanden direkt im Anschluss der Probennahme statt. Für die weiteren Analysen wurde die Proben für 10-15 min bei 3.260 x g zentrifugiert, der Überstand aliquotiert, bei -80°C eingefroren und bei -20°C gelagert. Vor den Analysen wurden die Proben auf Eis aufgetaut.

4.5.1 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Zunahme der Biomasse während der Kultivierung mit löslichen Medienbestandteilen sowie die Abnahme der Biomasse während der Hydrolyse pektinreicher Substrate wurde gravimetrisch quantifiziert. Dafür wurde ein festgelegtes, gut durchmischtes Volumen der Probe über zuvor bei 80°C getrocknet und vorgewogene Filter (Whatman, Grad 1 & 5, 55 mm Durchmesser, 11 & 2,5 µm Porengröße) filtriert und mit einem zuvor festgelegten Volumen deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Filter in Glaspetrischalen bei 80°C für mindestens 24 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde die Glaspetrischale mit enthaltenem Filter erneut gewogen. Aus der Differenz der beiden Wägungen und dem eingesetzten Flüssigkeitsvolumen wurde anschließend die Biotrockenmasse in g L⁻¹ berechnet. Alle Biomassebestimmungen wurden im Triplikat durchgeführt.

4.5.2 Morphologische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der pilzlichen Morphologie und Kontrolle möglicher Kontaminationen wurde ein repräsentativer Teil jeder Probe mikroskopisch betrachtet und die beobachtete Morphologie digital dokumentiert. Hierzu wurde Probenmaterial auf einen Objektträger aufgegeben und unter dem Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena, Deutschland) bei Vergrößerungen von 1,25x, 5x und 20x untersucht. Zur Aufnahme der mikroskopischen Bilder wurde eine 3,3-megapixel Digitalkamera (Axiocam ICc3, Zeiss, Jena, Deutschland) in Verbindungen mit der dazugehörigen Software (ZEN lite, Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

4.5.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand wurde das Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific™) nach Herstellerangaben (Micro Microplate Protocol 1 – 25 µg mL⁻¹) verwendet. Als Referenzprotein wurde Bovine Serum Album (BSA), welches mittels 100 mM Natriumcitrat-Puffer pH 4,5 zu Referenzlösungen im Konzentrationsbereich von 0-25 µg mL⁻¹ verdünnt wurde, verwendet. Jede untersuchte Probe wurde mit

100 mM Natriumcitrat-Puffer pH 4,5 verdünnt, sodass sich die Proteinkonzentration im Bereich der Referenzlösungen befand. Für die Messung der Proteinkonzentration wurden 150 μL jeder Probe und Referenzlösung im Triplikat in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde 150 μL des Coomassie Plus Reagenz hinzugefügt. Nach Mischung mittels eines Plattenschüttlers und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Absorption bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite[®] M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Zur Korrelation zwischen Proteinkonzentration und Absorption wurde ein Polynom dritten Grades verwendet.

4.5.4 Quantifizierung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand

Für die Quantifizierung der Polygalacturonaseaktivität wurde eine modifizierte Version des Fructan Assay Kit Protokolls (Megazyme Ltd., Bray, Irland) etabliert und verwendet. Die Aktivität wird dabei kolorimetrisch durch Bestimmung der Menge an reduzierenden Zuckern mittels p-Hydroxybenzoesäurehydrazid (PHBAH) ermittelt. In alkalischer Lösung reagiert das Säurehydrazid mit Kohlenhydraten zu gelben Anionen, welche bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert werden können (Lever 1972). Als Substrat für diese Bestimmungsmethode wurde Polygalacturonsäure verwendet, aus der die freien reduzierenden Zucker abgespalten werden. Als Aktivitätseinheit wurde die Einheit Unit gewählt. Dabei entspricht 1 Unit Polygalacturonaseaktivität der Generierung von 1 μmol D-Galacturonsäure pro min pro mL Kulturüberstand unter Assaybedingungen.

Als Standard wurde eine D-Galacturonsäurelösung mit Konzentrationen von 0 mM bis 2 mM verwendet. Zur Erstellung und Verdünnung des Standards und der Proben wurde ein 100 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 4,5) (vgl. Kapitel 4.2.4) verwendet. Die PHBAH Arbeitslösung wurde durch eine 1:10 Mischung aus Reagenz A und Reagenz B (Tabelle 4.5.1) direkt vor Beginn des Assays hergestellt. Alle Proben und Reagenzien wurden während der Durchführung des Assays auf Eis gelagert.

Für die Inkubation der Probe mit Polygalacturonsäure wurden folgende Schritte durchgeführt. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 100 μL der verdünnten Probe und 100 μL des Substrats (10 g L^{-1} Polygalacturonsäure) gemischt. Anschließend wurden 20 μL als Startwert vor Beginn der Inkubation in eine 96x Mikrotiterplatte übertragen. Das Reaktionsgemisch wurde dann für 60 min bei 30 °C und 1000 min^{-1} im Thermoschüttler (ThermoMixerC, eppendorf) inkubiert. Nach 20, 30, 40 und 60 min wurden jeweils 20 μL Probe genommen und ebenfalls in die 96x Mikrotiterplatte übertragen. Während der Inkubationszeit wurde der D-Galacturonsäurestandard in die 96x Mikrotiterplatte transferiert und 1:1 mit 100 mM Natriumcitrat-Puffer in der 96x Mikrotiterplatte verdünnt.

Um die freigesetzte D-Galacturonsäure zu detektieren, wurde anschließend die auf Eis gelagerte 96x Mikrotiterplatte weiterbearbeitet. Dazu wurden 150 μL der PAHBAH Arbeitslösung zu allen Proben und Standards hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Platte wurde mit einem PCR-Film verschlossen, für 6 min bei 96 °C im Thermoblock erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Nach der Farbreaktion wurden 125 μL des Standards unverdünnt in eine Mikrotiter Messplatte gegeben. Die Proben wurden 1:2 beziehungsweise 1:5 mit VE-Wasser in der Messplatte verdünnt. Abschließend wurde die Absorption bei 410 nm gemessen (Infinite® M200 Pro, Tecan).

Zur Berechnung der Enzymaktivität, wurde eine lineare Regression der Konzentrationen des D-Galacturonsäurestandards und deren Absorption durchgeführt. Anschließend konnte die freigesetzte D-Galacturonsäurekonzentration innerhalb der inkubierten Proben (nach Bereinigung der Absorptionswerte um ihren jeweiligen Startwert) mittels der Standardgerade unter Berücksichtigung der Inkubationszeit, der Verdünnungen und des Probenvolumens bestimmt werden. Die Analyse der Proben wurde in Triplikaten durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert der Triplikate mit deren Standardabweichung angegeben.

Das verwendete Substrat Polygalacturonsäure besteht aus α -1,4-verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten und ist das Hauptpolymer in Pektin. Trotz der Vielzahl an enzymatischen Aktivitäten, die zum Abbau von Pektin benötigt werden, wurde die hier bestimmte Polygalacturonaseaktivität als Indikator für die pektinolytische Aktivität der hergestellten Enzymmischungen im Kulturüberstand verwendet.

Zur Charakterisierung der Cellulaseaktivität in Abhängigkeit der Hydrolysetemperatur (Kapitel 5.4.5) wurde Carboxymethylcellulose als Substrat verwendet.

Tabelle 4.5.1: Zusammensetzung der PAHBAH Reagenzien.

	Chemikalie	Konzentration
Reagenz A	4-Hydroxybenzhydrazide	50 g L ⁻¹
	Salzsäure, 37 %	50 mL L ⁻¹
Reagenz B	Calciumchlorid Dihydrat	1,10 g L ⁻¹
	tri-Natriumcitrat Dihydrat	12,45 g L ⁻¹
	Natriumhydroxid	20 g L ⁻¹

4.5.5 Viskositätsbasierte Bestimmung der Pektinase-Aktivität

Zur Untersuchung der Enzymstabilität und Inhibierung des produzierten Enzymüberstands während dessen Einsatz zur Hydrolyse pektinreicher Reststoffe wurde eine viskositätsbasiertes Messmethode verwendet. Hierzu wurde die Pektinase bedingte Viskositätsabnahme einer 20 g L⁻¹ Pektin C Lösung durch Hinzugabe des Enzymüberstands mittels eines Rheometers (Rheolab QC, Anton Paar, Graz, Österreich) gemessen. Die Proben wurden 1:2 mit 100 mM Natriumcitrat-Puffer pH 4,5 verdünnt. Für die Messung wurden 12 mL der auf 30°C vortemperierten Zitruspektinlösung (20 g L⁻¹) mit 500 µL der verdünnten Probe vermischt und zügig in das Rheometer transferiert. Die Messung wurde bei einer konstanten Scherrate von 2000 s⁻¹ für 20 min (Messpunktdauer 10 s) bei pH 4,5 und 30 °C durchgeführt. Zur Negativkontrolle wurde die Probe durch inaktivierte Proben (10 min bei 90°C) oder Puffer ersetzt. Alle Viskositätsbestimmungen wurden im Triplikate durchgeführt.

4.5.6 Quantifizierung der Zuckerkonzentration im Kulturüberstand

Die Analyse der im Kultur- und Hydrolyseüberstand enthaltenen Zucker und organischen Säuren wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Hierbei wurden vor allem die Konzentrationen der freien Zucker quantifiziert, um die Enzymaktivität während der Kultivierung und den Hydrolyseerfolg bestimmen zu können. Zur Vorbereitung wurden die Proben nach dem Auftauen bei 90°C für 10 Minuten in einem Wasserbad inaktiviert und anschließend über Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm, Chromafil RC-20/15 MS, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland) in Rollrandflaschen mit 150 µL Mikroinsert sterilfiltriert. Sofern keine sofortige Messung möglich war, wurden die vorbereiteten Proben bei 4°C für eine maximale Dauer von einer Woche gelagert. Für die Messung wurde das in Tabelle 4.5.2 aufgeführte HPLC-System Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) unter den dort angegebenen Betriebsparametern verwendet. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte mit der Software ChemStation B.04.03 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). Zur genauen Quantifizierung der Zucker wurden externe Standards von D-Glucose, L-Arabinose, L-Fucose, in Konzentrationen von 0,078-15 g L⁻¹, L-Rhamnose und D-Galacturonsäure von 0,071-13,76 g L⁻¹ und D-Xylose, D-Mannose und D-Galactose mit jeweils 0,026-5 g L⁻¹ vermessen und deren Konzentration mit ihrer Peakfläche mittels linearer Regression korreliert.

Tabelle 4.5.2: Technische Daten und Betriebsparameter der verwendeten HPLC-Anlage

Technische Daten	
Pumpe	Agilent 1100 Series G1311A
Entgaser	Agilent 1100 Series G1322A
Probengeber	Agilent 1100 Series G1313A
Säulenofen	Spark-Holland Mistral
Detektor	Agilent 1200 Series G1362A RI-Detektor (bei 50 °C)
Trennsäule	Bio-Rad AMINEX® HPX87-H 300 mm x 7,8 mm
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge
Software	ChemStation B.04.03
Betriebsparameter	
Laufmittel	5 mM H ₂ SO ₄ (0,22 µm sterilfiltriert)
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	65 °C
Analysendauer	Standard: 17,5 min; Probe: 30 min
Flussrate	Isokratisch, 0,5 ml min ⁻¹

4.5.7 Quantifizierung der Zuckerzusammensetzung pektinreicher Reststoffe

Die Zusammensetzung der als Substrat verwendeten Zuckerrübenschnitzel wurde mit Hilfe eines zweistufigen Verfahrens (saure & enzymatische Hydrolyse) analysiert. Zur Vorbereitung wurden die Zuckerrübenschnitzel in einer Schwingmühle (MM 200, Retsch Technology GmbH) unter Verwendung von Mahlkugel aus Glas oder Edelstahl bei einer Schwingfrequenz von 25 Hz für 10 min zerkleinert und homogenisiert.

Die verwendeten Enzympräparate Viscozym® L und Pektinase aus *Aspergillus aculeatus* (beide durch Sigma-Aldrich vertrieben) wurden zur Verringerung von Messinterferenzen durch die stabilisierende Matrix vor ihrem Einsatz gereinigt. Hierzu wurden Zentrifugalkonzentratoren (molekulare Ausschlussgrenze (MWCO) 10.000 Da) eingesetzt. Die Enzympräparate (5 mL) wurden drei Mal mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5 gewaschen und anschließend im initialen Volumen suspendiert. Nach der Reinigung der Enzyme wurden die Enzympräparate gemischt

und im Verhältnis 1:250 in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5 verdünnt. Zur Konservierung wurde Kanamycin (50 mg L^{-1}) hinzugegeben.

Für die saure Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) wurden 100 mg der vorbehandelten Biomasse in eine 100 mL Schottflasche eingewogen, in 20 mL 2M TFA suspendiert und anschließend für 6 h bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Anschließend erfolgten Titration und Start der enzymatischen Hydrolyse unter aseptischen Bedingungen. Die säurevorbehandelte Biomasse wurde aus der Schottflasche in einen Messzylinder überführt. Die in der Schottflasche verbleibende Biomasse wurde mit 2,5 mL 1M Natriumacetatpuffer und 5 mL VE-Wasser in den Messzylinder gespült. Zur Einstellung des pH auf pH 5 wurde 10 M und 1 M NaOH, sowie 9 M H_2SO_4 verwendet. Anschließend wurde die Suspension auf ein Volumen von 40 mL mit VE-Wasser aufgefüllt und zurück in die Schottflasche überführt. Zuletzt wurde der Messzylinder mit 10 mL Enzymgemisch gespült und ebenfalls in die Schottflasche überführt (finale Enzymverdünnung 1:1250). Die anschließende enzymatische Hydrolyse fand für 60 h in einem Schüttel-Inkubator (WiseCube, witeg Labortechnik GmbH) bei pH 5, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 120 min^{-1} in 50 mM Natriumacetatpuffer statt.

Zur Quantifizierung des Verlustes von Monosacchariden während des Verfahrens wurden anstelle der Biomasse 1 mL eines vorbereiteten Zuckerstandards (D-Xylose, D-Mannose, L-Fucose, L-Arabinose, D-Glucose, L-Rhamnose, D-GalA, D-Galactose, D-Fructose, sowie D-Glucuronsäure in VE-Wasser gelöst – Konzentration pro Zuckermonomer 1 g L^{-1}) der gleichen Behandlung unterzogen. Mit der erhaltenen Ausbeute wurde ein Verlustausgleichsfaktor berechnet, mit dem der Verlust der Zucker während der Totalhydrolyse ausgleichen wurde. Alle Zusammensetzungsanalysen wurden im Triplikat durchgeführt.

Zur Bestimmung des nach der Hydrolyse zurückbleibenden Reststoffs wurde, nach Probenahme zur Analyse der Zuckerzusammensetzung mittels einer HPAEC-PAD (Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion - durchgeführt in Zusammenarbeit mit der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft, TU München), der gesamte Inhalt der Schottflasche ($\sim 49 \text{ mL}$) analog zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse (vgl. 4.5.1) analysiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Polygalacturonaseproduktion mit *A. niger* im Satzverfahren mit definiertem Medium¹

Als Grundlage für eine erfolgreiche Hydrolyse pektinreicher Agrarreststoffe und der daraus resultierenden Freisetzung von D-Galacturonsäure, wurde ein Bioprozess zur Herstellung pektinolytischer Enzyme mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* erarbeitet. Hierzu wurde ein kontrolliertes Satzverfahren mit definiertem Zitruspektin-Minimalmedium erarbeitet, mit dem verschiedene *A. niger* Stämme vergleichend charakterisiert wurden. Der am besten geeignete Stamm sollte anschließend als Basis für weitere genetische Optimierungen der Produktion pektinolytischer Enzyme beim Kooperationspartner dienen. Aufgrund des starken Zusammenhangs der pilzlichen Produktivität und der ausgebildeten Morphologie wurde anschließend der Effekt des rührerinduzierten Leistungseintrags untersucht.

5.1.1 Polygalacturonaseproduktion verschiedener *A. niger* Stämme

Zur Identifikation eines geeigneten Basisstammes wurden sechs Stämme aus den im Folgenden beschriebenen monophyletischen Gruppen vergleichend charakterisiert. Diese sechs Stämme wurden basierend auf folgenden Kriterien ausgewählt: Verfügbarkeit ihrer genomischen Sequenz, Abwesenheit von Auxotrophiemarkern, um phänotypische Unterschiede aufgrund von Veränderungen im zentralen Stoffwechsel zu vermeiden, die Abwesenheit genetischer Modifikationen bezüglich der Produktion pektinolytischer Enzyme und ihre Zuordnung zur biologischen Sicherheitsstufe 1, um eine Handhabung im Labor gewährleisten zu können.

Die Stämme der ersten Gruppe sind aus der Literatur für ihre einfache Handhabung und genetische Modifizierbarkeit im Labor bekannt. Aus dieser Gruppe wurden die Stämme *A. niger* NRRL3 und N402 untersucht. Die nächsten beiden Stämme *A. niger* ATCC 1015 und ATCC 11414 wurden aus der Gruppe der industriellen Zitronensäureproduzenten ausgewählt. Diese Gruppe ist aufgrund ihrer langjährigen Sekretionsoptimierung interessant, da sie eventuell auch Vorteile bei der Sekretion von Enzymen mitbringt. Die Stämme *A. niger* NRRL 3122 und CBS 513.88 aus der dritten Gruppe sind bekannt für ihre erhöhte Proteinproduktion und Sekretion ins Medium.

¹ Ein Teil der Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert in: Schäfer et al. (2020) Comparative evaluation of *Aspergillus niger* strains for endogenous pectin-depolymerization capacity and suitability for D-galacturonic acid production. *Bioprocess Biosyst Eng.* 43(9):1549-1560.

Vorauswahl der *A. niger* Stämme im Schüttelkolben

Alle sechs *A. niger* Stämme wurden im Schüttelkolben in 20 g L^{-1} Zitruspektin-Minimalmedium bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, in biologischen Triplikaten, kultiviert. Nach 96 h Stunden wurde die Polygalacturonaseaktivität gemessen. Die *A. niger* Stämme NRRL 3122 und CBS 513.88 zeigten die niedrigste Polygalacturonaseaktivität mit $174 \pm 41 \text{ U L}^{-1}$ und $345 \pm 199 \text{ U L}^{-1}$. Die vier weiteren Stämme *A. niger* NRRL3 ($607 \pm 174 \text{ U L}^{-1}$), N402 ($493 \pm 233 \text{ U L}^{-1}$), ATCC 1015 ($674 \pm 92 \text{ U L}^{-1}$) und ATCC 11414 ($543 \pm 246 \text{ U L}^{-1}$) zeigten höhere Aktivitäten und wurden deshalb für den Vergleich im Rührkesselreaktor ausgewählt (Abb. 5.1.1).

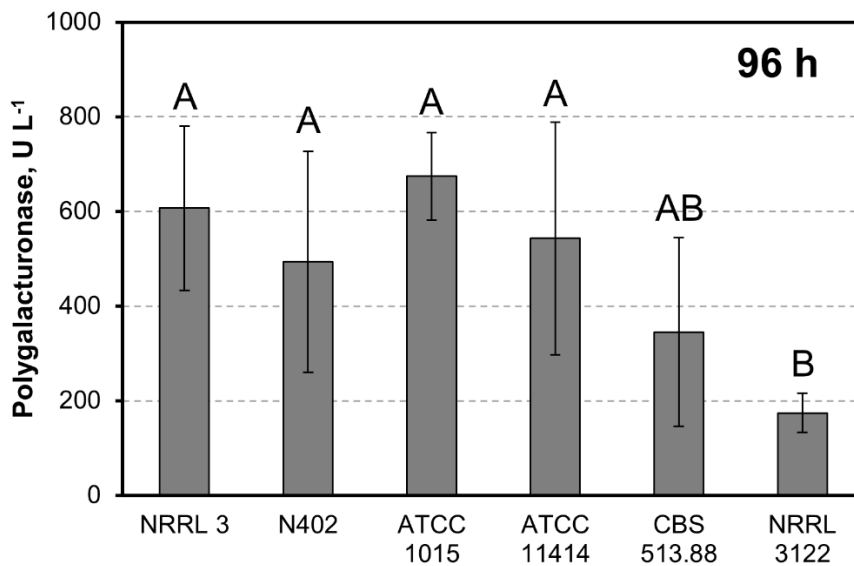


Abb. 5.1.1: Polygalacturonaseaktivität der *A. niger* Stämme NRRL3, N402, ATCC 1015, ATCC11414, CBS 513.88 und NRRL 3122 nach 96 h Kultivierung im Schüttelkolben. Die Prozesse wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und anschließend über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test ausgewertet. Unterschiede wurden mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bewertet. Die Gruppe AB zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Gruppe A oder B ($T = 30^\circ\text{C}$, initialer pH 4,5, $V_R = 0,025 \text{ L}$, $c_s = 20 \text{ g L}^{-1}$ Zitruspektin, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Vergleichende Charakterisierung der *A. niger* Stämme im Rührkesselreaktor

Die Kontrolle mechanischer und physiochemischer Parameter während der Kultivierung von *A. niger* ist aufgrund seines filamentösen Wachstums essenziell zur Bereitstellung bestmöglicher Bedingungen zur Herstellung pektinolytischer Enzyme. Im Sinne einer kontrollierbaren und zugleich reproduzierbaren Charakterisierung, wurden folglich die vier vorausgewählte *A. niger* Stämme NRRL3, N402, ATCC 1015, ATCC 11414 im Rührkesselreaktor vergleichend kultiviert. Hierzu wurde ein Satzverfahren im 3 L-Maßstab mit 20 g L^{-1} Zitruspektin-Minimalmedium, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, verwendet. Für die vergleichende Charakterisierung wurden die Zustandsgrößen Biotrockenmassekonzentration (BTM), Morphologie, Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität der vier Stämme ermittelt.

Der *A. niger* Stamm NRRL 3 zeigte nach 39 h seine maximale Biotrockenmassekonzentration von $2,28 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$. Anschließend fiel sie um 35 % bis zum Ende der Kultivierung auf $1,47 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ab (Abb. 5.1.2). Die Biomassekonzentration der *A. niger* Stämme N402 und ATCC 1015 zeigte ein ähnliches Verhalten. Bei beiden stieg sie bis 42 h Prozesszeit auf Maximalwerte von $3,65 \pm 0,35 \text{ g L}^{-1}$ (N402) und $3,38 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ (ATCC 1015) an, bevor sie sich in beiden Fällen bis zum Ende um bis zu 30 % verringerte (Abb. 5.1.2). Der *A. niger* Stamm ATCC 11414 zeigte einen unterschiedlichen Biotrockenmasseverlauf während der Kultivierung. Im Vergleich zu den anderen untersuchten *A. niger* Stämmen erreichte die Biotrockenmassekonzentration ihr Maximum von $2,68 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ sechs Stunden (48 h) verzögert und zeigte dann einen drastischen Abfall um 70 % auf $0,81 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierung (Abb. 5.1.2). Der Rückgang der Biotrockenmassekonzentration korrelierte in allen Prozessen mit ansteigenden Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Medium und sinkenden Kohlenstoffdioxidanteilen im Abgas. Dieses Verhalten kann als Indikator für eine weitestgehende Erschöpfung der Kohlenstoffquelle Zitruspektin gedeutet werden.

In Anbetracht des starken Zusammenhangs der pilzlichen Produktivität mit der in Submerskultivierung vorherrschenden Morphologie, wurde die Morphologie in allen Prozessen systematisch erfasst. Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen nach 9 h, 12 h, 19 h, 36 h und 88 h (Abb. 5.1.2) gemacht. Die Aufnahmezeitpunkte sind zusätzlich in den Diagrammen der Biotrockenmassekonzentrationsverläufen als schwarze Linien eingezeichnet. *A. niger* NRRL 3 und ATCC 11414 zeigten dispers, filamentöse Morphologie. Im Gegensatz dazu zeigten *A. niger* N402 und ATCC 1015 pelletartiges Wachstum. Bei dem Stamm N402 war dieses pelletartige Wachstum jedoch stärker ausgeprägt als bei ATCC 1015. Zum Ende der Kultivierung veränderte sich die Morphologie von NRRL 3 auch zu einer eher pelletartigen Morphologie. Während der Kultivierung aller Stämme außer ATCC 11414 konnte ab 34 h eine starke gelbe Färbung des Kultivierungsmediums beobachtet werden. Bei Stamm ATCC 11414 wurde nur eine milde gelbe Färbung nach 58 h beobachtet.

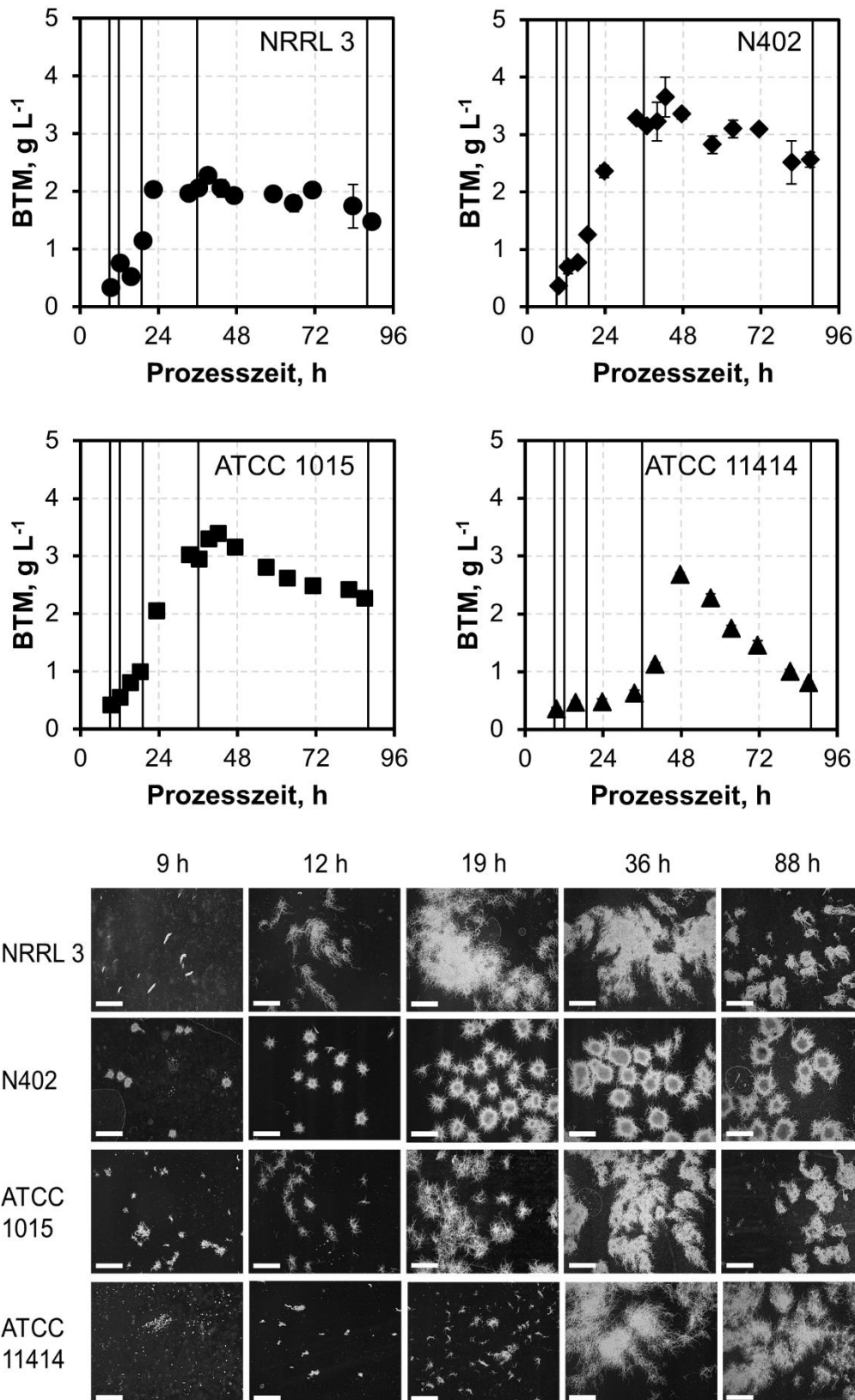


Abb. 5.1.2: Biotrockenmassekonzentration und Morphologie bei Kultivierungen verschiedener *A. niger* Wildtyp-Stämme. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM) der *A. niger* Stämme NRRL3 (●), N402 (◆), ATCC 1015 (■), ATCC 11414 (▲) und morphologische Veränderung während Satz kultivierungen im Rührkesselreaktor. Die schwarzen Linien in den BTM Diagrammen kennzeichnen den Zeitpunkt der morphologischen Analysen. Die weißen Maßstabsbalken repräsentieren 1 mm ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $V_R = 3 \text{ L}$, $c_S = 20 \text{ g L}^{-1}$ Zitruspektin, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Zusätzlich zur Biomassebildung und der sich dabei ausbildenden Morphologie wurde auch die Proteinkonzentration im Kulturüberstand untersucht (Abb. 5.1.3). Die sekretierte Proteinmenge von *A. niger* NRRL 3 erreichte nach annähernd linearer Zunahme bis zur 90 h eine maximale Konzentration von $157 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$. Die Stämme N402 und ATCC 1015 zeigten maximale Proteinkonzentrationen von $162 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$ (81 h) und $167 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ (71 h). In beiden Fällen stagnierte oder fiel die Proteinkonzentration nach dem Maximum, analog zum Abfall der Biotrockenmassekonzentration, bis zum Ende der Kultivierung ab (Abb. 5.1.2). In Übereinstimmung mit seiner verzögerten Biomassebildung zeigte der Stamm ATCC 11414 auch eine leicht verzögerte maximale Proteinkonzentration nach 87 h von $111 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$. Verglichen mit den anderen Stämmen war seine maximale Proteinkonzentration um circa 32 % verringert. Die biomassebezogene Proteinkonzentration war jedoch vergleichbar mit den drei anderen *A. niger* Stämmen NRRL3, N402 und ATCC 1015.

Das Ziel des Stammvergleichs war die Identifikation des produktivsten *A. niger* Stamms. Aus diesem Grund wurde die sekretierte Polygalacturonaseaktivität als ausschlaggebende Zustandsgröße für die abschließende Bewertung der Stämme gemessen (Abb. 5.1.3). Dabei zeigten die Stämme NRRL 3 und ATCC 11414, beide dispers myzelartig wachsend, höhere Polygalacturonaseaktivität als die beiden Stämme *A. niger* N402 und ATCC 1015. Die Polygalacturonaseaktivität des *A. niger* Stammes NRRL3 stieg zwischen der 36 h und 59 h stark an und erreichte am Ende der Kultivierung ihre maximale Aktivität von $1379 \pm 98 \text{ U L}^{-1}$. Die höchste Polygalacturonaseaktivität wurde von *A. niger* ATCC 11414 produziert, bei dem die Aktivität über die Kultivierung zunächst zunahm und ab 72 h bei einem Maximum von $1524 \pm 35 \text{ U L}^{-1}$ stagnierte.

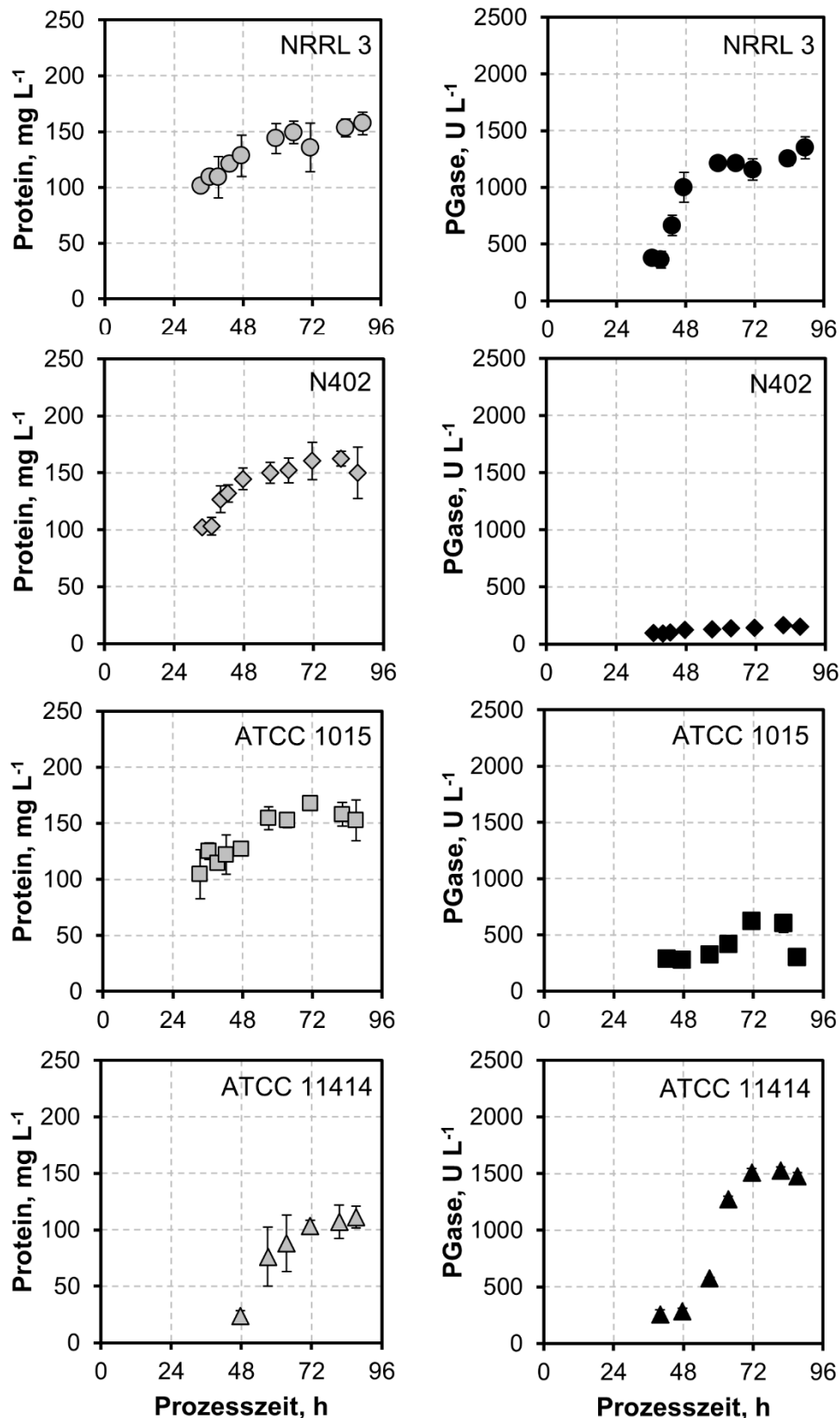


Abb. 5.1.3: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Kultivierungen verschiedener *A. niger* Wildtyp-Stämme. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Satzkultivierungen der *A. niger* Stämme NRRL3 (○), N402 (◇), ATCC 1015 (□), ATCC 11414 (△) im Rührkesselreaktor ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $V_R = 3 \text{ L}$, $c_s = 20 \text{ g L}^{-1}$ Zitruspektin, 10^9 Sporen L^{-1}).

Diskussion

Nach Vorauswahl der Stämme im Schüttelkolben wurden die Stämme mit niedriger Polygalacturonaseproduktion *A. niger* CBS 513.88 und sein naher Verwandter NRRL 3122 für die vergleichende Charakterisierung im Rührkesselreaktor ausgeschlossen. Diese beiden Stämme unterscheiden sich gegenüber der beiden Gruppen um ATCC 1015 und NRRL 3 durch einen horizontalen Gentransfer des *glaA* Gens, welches für eine Glucoamylase codiert, und eine Verstärkung der dazugehörigen Proteinbiosynthese (Andersen et al. 2011). In Anbetracht ihrer niedrigeren Polygalacturonaseaktivität scheinen diese Veränderungen keinen Vorteil bei der Produktion und Sekretion pektinolytischer Enzyme zu haben.

Während des Stammvergleichs unter kontrollierten Bedingungen im Rührkesselreaktor konnte beobachtet werden, dass die sekretierte Proteinmenge und Biomassebildung nicht mit der produzierten Polygalacturonaseaktivität korrelierten. Die Aktivitätsverläufe zeigten, dass die verschiedenen Stämme deutliche Unterschiede im Biomassewachstum und in der Regulation und Expression pektinolytischer Enzyme aufweisen. Da alle vier Prozesse unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, weisen diese Ergebnisse auf eine stark unterschiedliche physiologische Regulation hin, die nicht durch alleinigen Vergleich ihrer genomischen Daten erklärt werden kann (Andersen et al. 2011). Dispers myzelartiges Wachstum, wie es für die *A. niger* Stämme NRRL 3 und ATCC 11414 beobachtet werden konnte, gilt als vorteilhaft für die Sekretion von Proteinen während der Submerskultivierung von *A. niger* und anderer filamentöser Pilze (Kurt et al. 2018; Veiter et al. 2018; Wucherpennig et al. 2010). Analog zur Literatur ließ sich diese Beobachtung für die Polygalacturonaseaktivität, nicht jedoch für die Gesamtproteinsekretion, verifizieren. Die charakteristische Gelbfärbung des Mediums während der Kultivierung passt zur Beschreibung der Bildung von Aurasperon, das als bekanntes Nebenprodukt während der Kultivierung von *A. niger* gebildet werden kann und zu einer Gelbfärbung des Mediums führt (Tanaka et al. 1966).

Durch diesen Stammvergleich konnte mit *A. niger* ATCC 11414 ein aussichtsreicher Stamm für die weiteren Untersuchungen zur Sekretion pektinolytischer Enzyme gefunden werden. Mit einer um 10 % höheren (und circa 24 h schnelleren) Polygalacturonaseproduktion im Vergleich zum zweitbesten Stamm NRRL 3 wurde er in den folgenden Untersuchungen zur Polygalacturonaseproduktion von *A. niger* als Basisstamm verwendet.

5.1.2 Variation Leistungseintrag bei der Polygalacturonaseproduktion

Die Produktivität von filamentösen Mikroorganismen wie *A. niger* ist stark mit der sich während der Kultivierung ausbildenden Morphologie verknüpft, die wiederum von verschiedenen Kultivierungsvariablen, wie pH, Temperatur, Medienzusammensetzung, Inokulationskonzentration und dem mechanischen Leistungseintrag beeinflusst wird. Daher sollte der Einfluss des rührerinduzierten volumetrischen Leistungseintrags, folgend kurz Leistungseintrag genannt, auf die Morphologie und Polygalacturonaseproduktion des im Stammvergleich ausgewählten *A. niger* ATCC11414 untersucht werden.

Hierzu wurden die sechs in Tabelle 5.1.1 dargestellten Leistungseinträge untersucht. Für die Prozesse wurde das in Kapitel 4.3.4 beschriebene Satzverfahren mit 20 g L⁻¹ Zitruspektin-Minimalmedium verwendet. Die Rührerdrehzahl wurde anschließend je nach gewünschtem Leistungseintrag auf 400, 500, 600, 700, 800 und 900 min⁻¹ eingestellt.

Tabelle 5.1.1:Untersuchte Leistungseinträge im 1,5 L-Maßstab.

Untersuchte Leistungseinträge, W L ⁻¹					
1,9	2,3	2,9	3,4	3,9	5,0
(400 min ⁻¹)	(500 min ⁻¹)	(600 min ⁻¹)	(700 min ⁻¹)	(800 min ⁻¹)	(900 min ⁻¹)
Korrespondierende Rührerspitzen-geschwindigkeit, m s ⁻¹					
0,96	1,2	1,45	1,69	1,93	2,17

Mit einer Erhöhung des Leistungseintrags wurde eine Verringerung der maximalen Biotrockenmassekonzentration beobachtet (Abb. 5.1.4). Bei den beiden niedrigsten Leistungseinträgen von 1,9 W L⁻¹ und 2,3 W L⁻¹ konnten die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen beobachtet werden. Bei 1,9 W L⁻¹ stieg die Biomassekonzentration über 72 h auf einen Maximalwert von 4,48 ± 0,34 g L⁻¹ an. Während der Kultivierung mit 2,3 W L⁻¹ lag die maximale Biotrockenmassekonzentration von 3,70 ± 0,05 g L⁻¹ schon nach 57 h vor. Bei Leistungseinträgen von 2,9 WL⁻¹ und 3,4 WL⁻¹ wurden nach 48 h Biotrockenmassekonzentrationen von 2,55 ± 0,03 g L⁻¹ und 2,9 ± 0,10 g L⁻¹ erreicht. Die Kultivierung bei einem Leistungseintrag von 3,9 W L⁻¹ zeigte ein um 10 h verzögertes Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration. Es wurde jedoch eine ähnlich hohe Konzentration von 2,88 ± 0,11 g L⁻¹ erreicht. Beim höchsten untersuchten Leistungseintrag von 5,0 W L⁻¹ wurde, im Vergleich zu allen anderen Prozessen, die niedrigste maximal Biotrockenmassekonzentration von 2,00 ± 0,11 g L⁻¹ beobachtet. In allen Prozessen fiel die Biomassekonzentration nach Erreichen ihres Maximalwertes bis zum Ende der Satzkultivierung wieder ab. Parallel zur Reduktion der Biomassekonzentration konnte auch ein Abfall der Atmungsraten beobachtet werden. Daraus ist zu

erkennen, dass es zum Ende der Satzkultivierung höchstwahrscheinlich zu einer Nährstofflimitation gekommen ist.

Bei der Analyse der mikroskopischen Aufnahmen der Pilzmorphologie zeigte sich, dass der Leistungseintrag einen starken Einfluss auf die sich während der Kultivierung ausbildende Morphologie hat (Abb. 5.1.4). Mit zunehmendem Leistungseintrag konnte eine Veränderung der Morphologie von „fluffigen“ Pellets über disperses Myzel (niedriger Leistungseintrag) hin zu sphärischen, sehr kompakten Pellets (hoher Leistungseintrag) beobachtet werden.

Die Analyse der Proteinkonzentration im Überstand der Prozesse zeigte Unterschiede in der Sekretionsgeschwindigkeit und Menge zum Ende der Kultivierung. Tendenziell wurden bei niedrigerem Leistungseintrag höhere Menge Protein (zwischen $140\text{-}165\text{ mg L}^{-1}$) sekretiert als bei hohem Leistungseintrag ($106\text{-}117\text{ mg L}^{-1}$) (Abb. 5.1.4). Bei der Betrachtung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand zeigten die Prozesse mit den Leistungseinträgen von $2,9\text{ W L}^{-1}$ und $3,4\text{ W L}^{-1}$ ($1,2\text{-}1,9\text{ U mL}^{-1}$) die höchsten Aktivitäten (Abb. 5.1.4). Bei dem Prozess mit $2,9\text{ W L}^{-1}$ konnte die maximale Aktivität von bis zu $1,9\text{ U mL}^{-1}$ sogar bis zum Ende des Prozesses aufrechterhalten werden. Die Prozesse mit niedrigeren und höheren Leistungseinträgen als $2,9\text{ W L}^{-1}$ oder $3,4\text{ W L}^{-1}$ zeigten geringere Polygalacturonaseaktivitäten (Abb. 5.1.4).

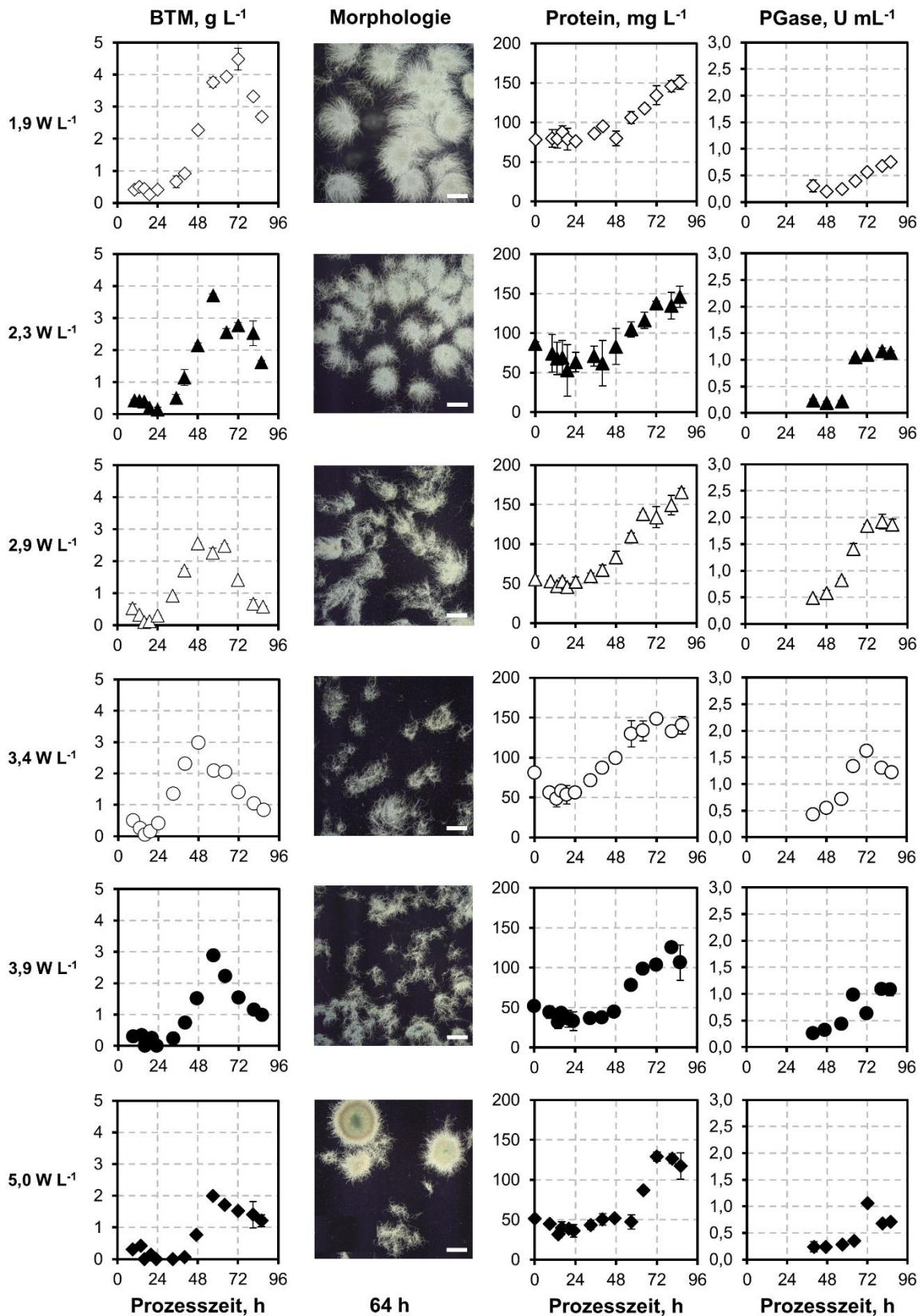


Abb. 5.1.4: Biotrockenmassekonzentration (BTM), Morphologie, Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) von *A. niger* ATCC 11414 in Abhängigkeit des Leistungseintrages. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 in Abhängigkeit des rührerinduzierten, volumetrischen Leistungseintrags: 1,9 W L⁻¹ (◇), 2,3 W L⁻¹ (▲), 2,9 W L⁻¹ (△), 3,4 W L⁻¹ (○), 3,9 W L⁻¹ (●) und 5,0 W L⁻¹ (◆). Die morphologischen Bilder wurden nach 64 h aufgenommen (Maßstabsbalken = 500 µm). (T = 30°C, pH 4,5, V_R = 3 L, c_s = 20 g L⁻¹ Zitruspektin, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Diskussion

Die beobachteten Auswirkungen auf die Satzprozesse können sehr wahrscheinlich auf eine durch den Leistungseintrag bedingte Regulation unterschiedlicher zellulärer Aktivitäten zurückgeführt werden. Bei niedrigerem Leistungseintrag wird die Biomassebildung bevorzugt, wohingegen bei sehr hohen Leistungseinträgen die Bewältigung des induzierten Stresses im Vordergrund steht. Aus diesem Grund könnte das gefundene Aktivitätsmaximum in einem Bereich liegen, in dem beide Phänomene gleich stark ausgeprägt sind und somit die Enzymsekretion nicht beeinträchtigt oder sogar begünstigt wird. Ein weiterer Aspekt ist die für die Sekretion bevorzugte dispers, myzelartige Morphologie, die sich durch die Wahl eines geeigneten Leistungseintrags einstellen lässt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in anderen Studien bei Variation des Leistungseintrags während der Produktion von Enzymen mit filamentösen Pilze gemacht werden (Kiep 2011; Wucherpfennig et al. 2010).

Als Antwort auf den induzierten Scherstress während der Kultivierung bei hohem Leistungseintrag bildete der Pilz pelletartige Strukturen aus, da diese scherunempfindlicher sind als disperses Myzel. Diese Beobachtung wird auch in der Literatur beschrieben (Veiter et al. 2018; Wucherpfennig et al. 2010).

Während der Untersuchung konnten Unterschiede im Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium beobachtet werden. Wie erwartet, konnte die Gelöstsauerstoffkonzentration bei höheren Leistungseinträgen besser kontrolliert werden. Dies liegt auf verfahrenstechnischer Ebene an der besseren Gasblasendispergierung bei höherem Leistungseintrag. Bei niedrigeren Rührerdrehzahlen, sprich niedrigerem Leistungseintrag, kommt ein gegenläufiger Effekt hinzu. Durch die höhere Biomassekonzentration steigt der Sauerstoffbedarf während das myzelartige Wachstum die Viskosität des Mediums erhöht und somit auch die Gasblasendispersion und den Stofftransport erschwert.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass der rührerinduzierte, volumetrische Leistungseintrag auch in diesem Prozess zur Herstellung pektinolytischer Enzyme eine große Rolle spielt. Er beeinflusst die Zustandsgrößen Biotrockenmassekonzentration, Morphologie, Proteinsekretion und Polygalacturonaseaktivität stark und muss deshalb kontrolliert werden, um eine hohe Produktivität von *A. niger* ATCC11414 gewährleisten zu können. Die höchste Polygalacturonaseaktivität konnte in den Satzprozessen mit einem Leistungseintrag von rund 3 W L^{-1} produziert werden, weshalb dieser Leistungseintrag während weiterer Untersuchungen eingestellt werden sollte. Im Vergleich zu der sekretierten Aktivität von $1,52 \text{ U mL}^{-1}$ während des Stammvergleichs (vgl. Kapitel 5.1.1) konnte die Polygalacturonaseaktivität von *A. niger* ATCC 11414 durch Ermittlung des geeigneten Leistungseintrags um rund 20 % auf $1,9 \text{ U mL}^{-1}$ gesteigert werden.

5.2 Polygalacturonaseproduktion mit *A. niger* ATCC 11414 und Zuckerrübenschnitzeln

Nach der zuvor abgeschlossenen Stammauswahl und der Untersuchung des rührerinduzierten Leistungseintrags unter Verwendung von Zitruspektin als Modells substrat, wurde die Produktion pektinolytischer Enzyme mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat untersucht.

5.2.1 Variation der eingesetzten Substratkonzentration

Der Einsatz von Zuckerrübenschnitzeln als Induktor der Enzymsekretion ist von entscheidender Bedeutung, da so auf das Substrat spezifisch angepasste Enzymmischungen hergestellt werden, die anschließend eine effiziente Hydrolyse ermöglichen. Es wurden Konzentrationen der eingesetzten Zuckerrübenschnitzelsuspension zwischen 20 g L^{-1} und 35 g L^{-1} im Rührkesselreaktor untersucht. Alle weiteren Bestandteile des Mediums wurden während dieser Untersuchung nicht verändert. Die Durchführung der Prozesse ist in Kapitel 4.3.4 beschrieben. Als Stickstoffquelle wurde $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ Natriumnitrat verwendet.

Der Einsatz des suspendierten Substrats Zuckerrübenschnitzel hatte zur Folge, dass die Bestimmung des Wachstums über eine Biotrockenmassenbestimmung mit Filterpapier nicht angewendet werden konnte. Diese Problematik ist bei der Kultivierung von Mikroorganismen mit Feststoffen in Suspension bereits bekannt. In dem hier vorliegenden Fall wurde die respiratorische Aktivität als indirektes Maß für die metabolische Aktivität ausgewählt. Andere Methoden, bei denen fast ausschließlich Zellbestandteile oder Biosyntheseprodukte gemessen werden, sind meistens mit Messmethoden verbunden, die aufwendiger und fehleranfälliger sind als die online Messung der respiratorischen Aktivität.

Durch den Einsatz von Zuckerrübenschnitzel als Substrat konnte zu Beginn der Prozesse vermehrt eine Vereinzelnung (Deaggregation) auskeimender Sporen beobachtet werden, die so dominant bei den Prozessen mit Zitruspektin nicht zu beobachten war (Abb. 5.2.1). Außerdem kam es bei den Prozessen mit Zuckerrübenschnitzel ausschließlich zu einer myzelartig, dispersen Morphologie während der Kultivierung.

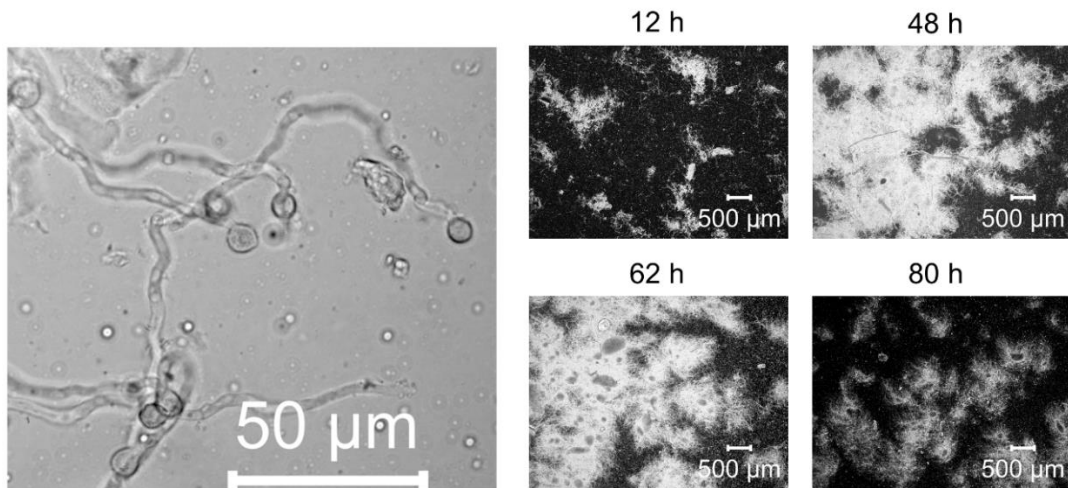


Abb. 5.2.1: Mikroskopische Aufnahmen während der Kultivierung des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von *A. niger* ATCC 11414 während der Auskeimung der Sporen (9h, links) und im Verlauf der Kultivierung mit 30 g L^{-1} Substrat (rechts). ($T = 30^\circ\text{C}$, $P \text{ V}^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, 10^9 Sporen L^{-1}).

Der Verlauf der Zuckerkonzentrationen während der Kultivierung zeigte in allen vier Prozessen einen ähnlichen Verlauf (Abb. 5.2.2). Zu Beginn der Kultivierung lagen die Zuckermonomere Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose frei im Medium vor. Diese wurden durch die zuvor durchgeführte thermische Vorbehandlung während der Sterilisation des Mediums freigesetzt. Die Freisetzung wurde in Voruntersuchungen bestätigt, bei denen die Zuckerkonzentration im Medium vor und nach Sterilisation bei 121°C für 20 min bestimmt wurde. Die Konzentration dieser fünf Zuckermonomere war proportional zur eingesetzten Substratkonzentration und lag zwischen $0,5$ und $1,2 \text{ g L}^{-1}$. Die freien Zuckermonomere wurden innerhalb der ersten 19 h nach Start der Kultivierung metabolisiert. Anschließend konnte eine Freisetzung des Zuckers Arabinose und der Zuckersäure D-Galacturonsäure beobachtet werden (Abb. 5.2.3). In den Prozessen mit 20 g L^{-1} , 25 g L^{-1} und 30 g L^{-1} Substrat konnte schon ab der 19 h eine Zunahme der Arabinosekonzentration gemessen werden. Diese Zunahme konnte bei der höchsten Substratkonzentration (35 g L^{-1}) erst rund 5 h später, also nach 24 h Prozesszeit beobachtet werden. Die Konzentration der freigesetzten Arabinose verhielt sich hierbei jedoch nicht proportional zur eingesetzten Zuckerrübenschnitzelkonzentration. Die gemessene Konzentration stieg bis zu einer Substratkonzentration von 30 g L^{-1} an, sodass in den Prozessen maximale Konzentrationen von $0,93 \text{ g L}^{-1}$ ($c_s = 20 \text{ g L}^{-1}$), $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ($c_s = 25 \text{ g L}^{-1}$) und $1,45 \text{ g L}^{-1}$ ($c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$) Arabinose gemessen werden konnten. Während der Kultivierung mit 35 g L^{-1} konnte jedoch nur eine maximale Konzentration von $1,12 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose bestimmt werden. Eine Zunahme der D-Galacturonsäure konnte zeitgleich zur Zunahme der Arabinosekonzentration beobachtet werden. Dabei wurde nur im Versuch mit einer Substratkonzentration von 35 g L^{-1} eine D-Galacturonsäurekonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ überschritten. Ab 48 h

Prozesszeit konnte bis zum Ende der Kultivierung keine Akkumulation freier Zucker nachgewiesen werden.

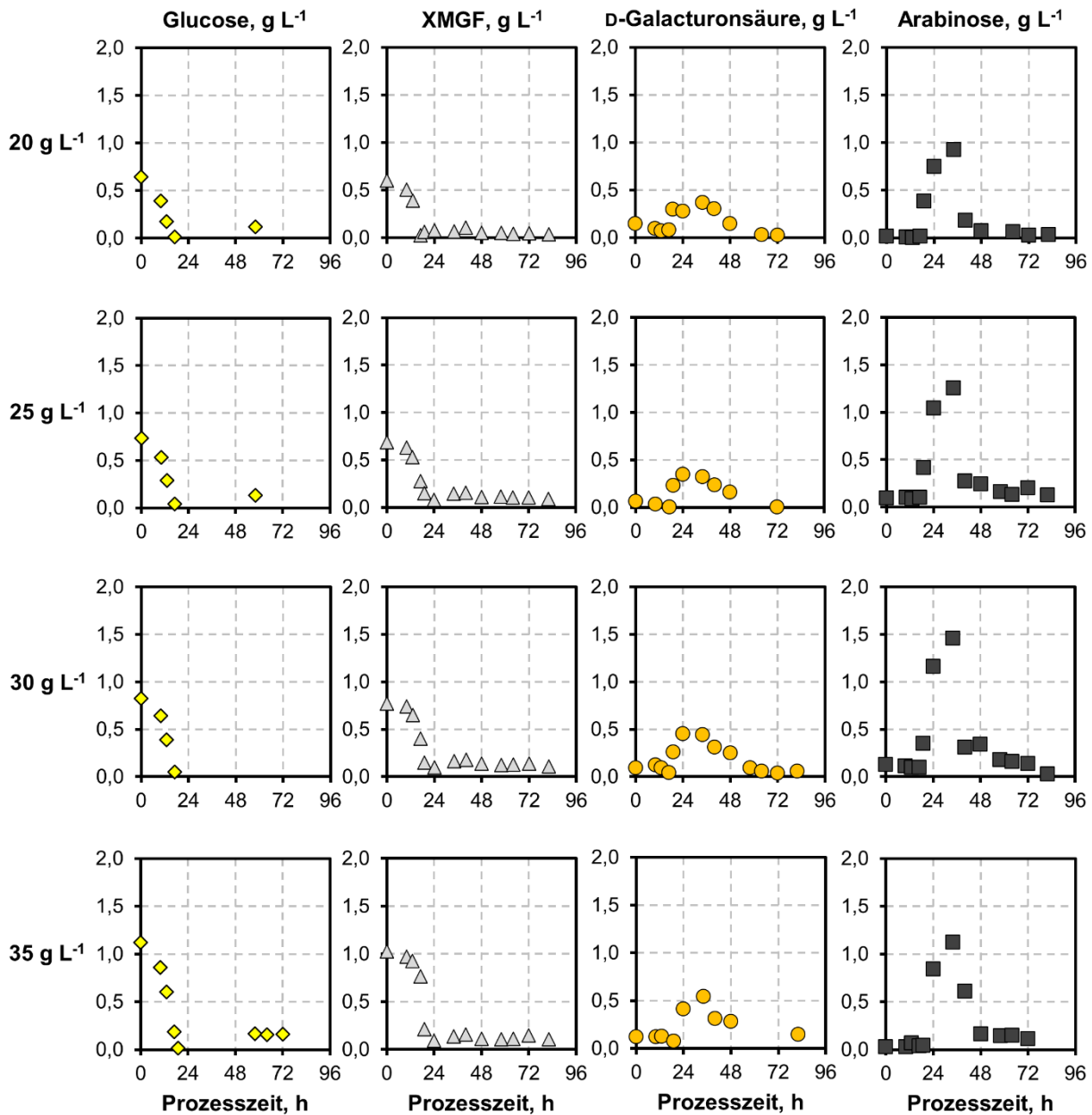


Abb. 5.2.2: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit Substratkonzentrationen von 20-35 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Glucose (◇, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fructose XMGF (△, hellgrau), D-Galacturonsäure (●, orange) und L-Arabinose (■, dunkelgrau). (T = 30°C, pH 4,5, P V⁻¹ = 3 W L⁻¹(600 min⁻¹), F_{Luft} = 0,2 bis 2 vvm, V_R = 0,7 L, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Die auf Basis der Abgasanalyse berechneten respiratorischen Aktivitäten von *A. niger* sind in Abb. 5.2.3 dargestellt. Nach Start der Begasung konnte in allen Prozessen sowohl für die Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER, carbon dioxide evolution rate) als auch für die Sauerstoffaufnahme (OUR, oxygen uptake rate) ein linearer Anstieg bis 17 h Prozesszeit beobachtet

werden. Anschließend konnte eine kurze Stagnationsphase beobachtet werden, auf die eine kontinuierliche Zunahme der CER in allen Prozessen bis auf ihre Maximalwerte nach 40 h folgte. Dabei wurden Maximalwerte von $0,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in den Prozessen mit den beiden höheren Substratkonzentrationen 30 g L^{-1} und 35 g L^{-1} und $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 20 g L^{-1} und 25 g L^{-1} gemessen. Anschließend fiel die CER bis zum Prozessende aller Kultivierungen ab.

Bei der OUR konnten deutliche Unterschiede im Verlauf und bei den maximal erreichten Raten beobachtet werden (Abb. 5.2.3). Die Sauerstoffaufnahme in allen vier Satzprozessen zeigten ihre Maximalwerte zwischen 42 h und 48 h. Dabei konnten maximale Aufnahmeraten von $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in den Prozessen mit 30 g L^{-1} und 35 g L^{-1} , $0,8 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 20 g L^{-1} und $0,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 25 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln gemessen werden. Nach 60 h verlief die OUR der beiden höheren Substratkonzentrationen 30 g L^{-1} und 35 g L^{-1} konstant bei $1,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierung. In den Satzprozessen mit 20 g L^{-1} und 25 g L^{-1} fiel sie bis zum Ende der Kultivierung auf $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab. Die Abweichung der Kurvenform der beiden Prozesse bei 20 g L^{-1} und 25 g L^{-1} in beiden Abbildungen ist auf ein technisches Problem der automatischen Regelung der Begasungsrate zurückzuführen (blaue und graue Kurven in Abb. 5.2.3).

Die totale Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels Bradford-Methode quantitativ bestimmt. Bei dieser Bestimmungsmethode wurden sowohl die durch *A. niger* sekretierte als auch die durch die Zuckerrübenschnitzel ins Medium eingebrachte Proteinmengen quantifiziert. Aus der Verstoffwechslung der durch die Zuckerrübenschnitzel eingebrachten Proteine und der gleichzeitigen Zunahme der durch *A. niger* sekretierten Proteine ergaben sich die Abb. 5.2.3 dargestellten Verläufe. Zu Beginn der Prozesse mit Substratkonzentrationen von 20 g L^{-1} , 25 g L^{-1} und 30 g L^{-1} konnten Proteinkonzentrationen von rund 290 mg L^{-1} gemessen werden. Dagegen wurde im Versuch mit einer Substratkonzentration von 35 g L^{-1} , analog zur erhöhten Konzentration freier Zucker im Medium, eine höhere Konzentration an Protein im Überstand ($365 \pm 18 \text{ mg L}^{-1}$) gemessen. Nach Start der Kultivierungen nahm die Konzentration bis zur 18 h und bei 35 g L^{-1} bis 24 h ab. Ab diesen Zeitpunkten zeigte die Proteinkonzentration bis zum Ende der Kultivierung eine Zunahme. Unter der Annahme, dass zum Ende der Kultivierung fast ausschließlich durch den Pilz sekretiertes Protein vorliegt, wurde in den Prozessen mit den Substratkonzentration 20 g L^{-1} und 25 g L^{-1} rund 250 mg L^{-1} extrazelluläres Protein produziert. Bei einem Einsatz von 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel wurden 300 mg L^{-1} und bei 35 g L^{-1} rund 380 mg L^{-1} produziert.

Die wichtigste und damit entscheidende Prozessgröße für die effiziente Hydrolyse pektinreicher Reststoffe ist die Polygalacturonaseaktivität im Kultivierungsüberstand. Um bestimmen zu können, bei welcher der untersuchten Substratkonzentration die höchste enzymatische Aktivität vorlag, wurde die Polygalacturonasekonzentration im Überstand gemessen. Die

Polygalacturonaseaktivität in den Prozessen mit den beiden niedrigen Substratkonzentration 20 g L⁻¹ und 25 g L⁻¹ stieg bis zum Ende der Kultivierung auf 6,65 ± 1,21 U ml⁻¹ und 5,53 ± 0,21 U ml⁻¹ an. In Prozessen mit höherer Substratkonzentration konnten hingegen höhere Polygalacturonaseaktivitäten beobachtet werden. Nach annähernd linearem Anstieg in der Kultivierung mit 30 g L⁻¹ wurde die höchste Aktivität von 11,06 ± 2,04 U ml⁻¹ ab 82 h Prozesszeit gemessen. Der Prozess bei 35 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel zeigte wiederum eine niedrigere Aktivität von 9,97 ± 0,36 U ml⁻¹.

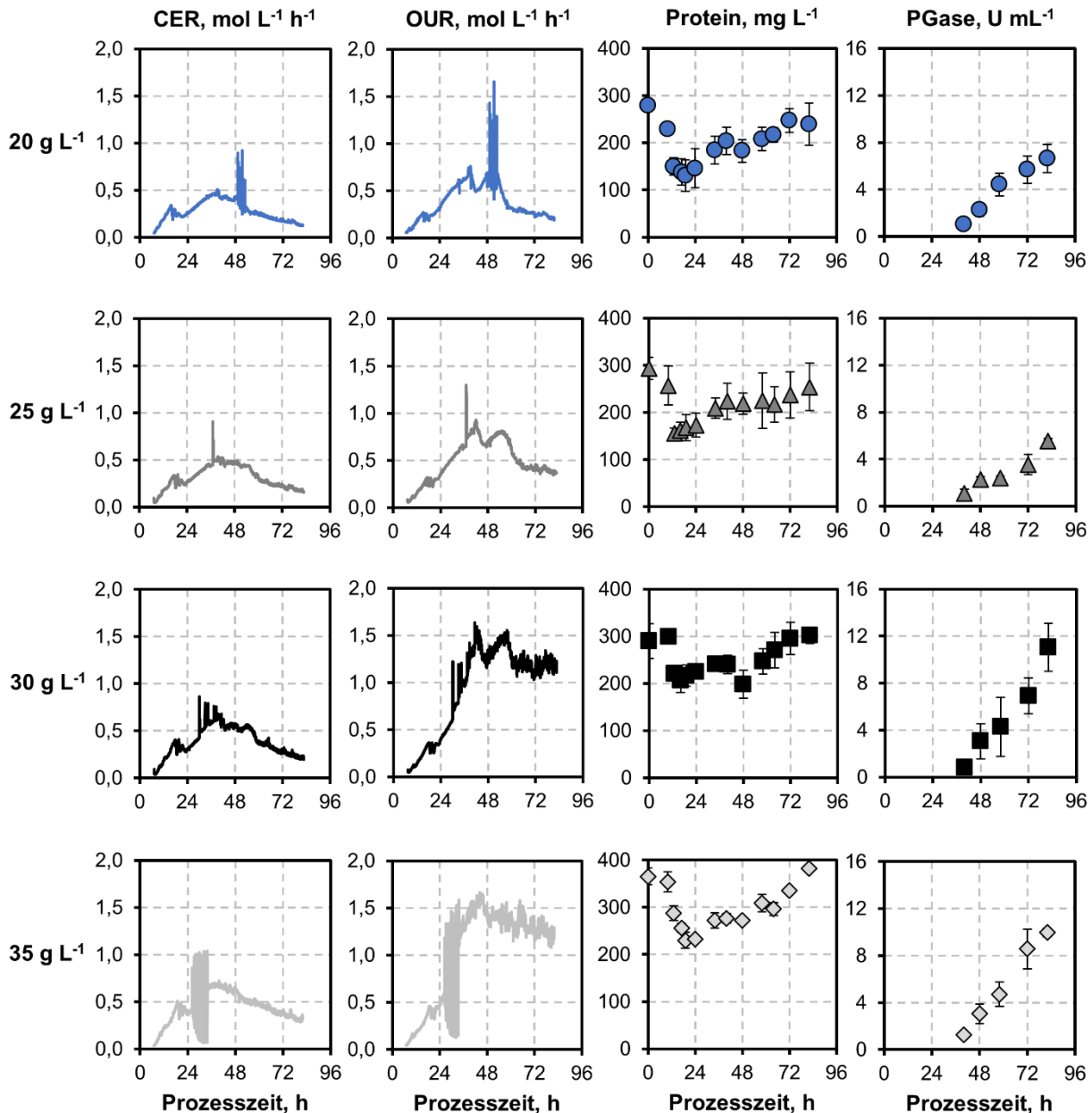


Abb. 5.2.3: Prozessdaten der Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit Substratkonzentrationen von 20-35 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 mit 20 g L⁻¹ (● —, blau), 25 g L⁻¹ (▲ —, dunkelgrau), 30 g L⁻¹ (■ —, schwarz) und 35 g L⁻¹ (◇ —, hellgrau) Zuckerrübenschnitzel. (T = 30°C, pH 4,5, P V⁻¹ = 3 W L⁻¹(600 min⁻¹), F_{Luft} = 0,2 bis 2 vvm, V_R = 0,7 L, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Diskussion

Nach der Umstellung von Zitruspektin auf Zuckerrübenschnitzel als Substrat und Induktor konnten aufgrund der Heterogenität und Komplexität des Substrats deutliche Veränderungen der Satzprozesse beobachtet werden. Innerhalb der ersten 24 h nutzte *A. niger* ATCC11414 hauptsächlich die im Medium frei verfügbaren Zucker Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose. Zusätzlich konnte mit der Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand eine Metabolisierung der durch die Zuckerrüben eingebrachten Proteine beobachtet werden. Ab der 17 h konnte nach Verbrauch der initial frei verfügbaren Zucker anhand der CER und OUR eine Anpassung des Stoffwechsels beobachtet werden. Je nach Substratkonzentration kam es hierbei zu zeitlichen Unterschieden in der pektinolytischen Aktivität. Als Grund dafür kann die dann einsetzende Freisetzung und Verstoffwechselung von Arabinose und D-Galacturonsäure bis 48 h angenommen werden. In diesem Zeitfenster konnte die höchste Kohlenstoffdioxidproduktion beobachtet werden.

Der Verbrauch der freien Zucker im Medium bewirkt die Aufhebung der Kohlenstoffkatabolitrepression und resultiert in der Sekretion hydrolytischer Scavenger-Proteine für die Verwertung komplexerer Kohlenstoffquellen wie Pektin oder Arabinan (Brown et al. 2014; Krohn et al. 2014). Die dabei freigesetzten Saccharide dienen als spezifische Autoinduktoren für die Produktion lytischer Enzyme und zugrundeliegender Stoffwechselwege und führen damit zu einer perfekten Anpassung des Pilzes an die im Medium vorliegende Kohlenstoffquelle (Benz et al. 2014a). Der pektinolytische Regulator RhaR reagiert beispielsweise auf D-Galacturonsäure, Rhamnose und Arabinose und kontrolliert die Stoffwechselwege im Pektin- und den Rhamnoseabbau (Watanabe et al. 2008). Solche Regulationswege sind auch für die Hemicellulase-, Arabinase-, Pektinase- und Cellulaseproduktion beschrieben (Battaglia et al. 2011; Brown et al. 2014; Hasper et al. 2004).

Die verstärkte auto-induzierte Sekretion pektinolytischer und arabinolytischer Enzyme erfordert mehrere regulatorische Schritte, weswegen die Polygalacturonaseproduktion und die steigende Arabinosekonzentration zeitverzögert erst 24 h oder 17 h nach Erschöpfung der Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose im Medium auftraten (Brown et al. 2014).

Während der Kultivierung mit Zuckerrübenschnitzel als Substrat konnte ausschließlich eine disperse, myzelartige Morphologie beobachtet werden. Dies könnte an der Beschaffenheit (Partikelgröße) der Zuckerrübenschnitzel und deren Wechselwirkung mit den Sporen während der Auskeimungsphase oder dem Pilzmyzel während der Kultivierung liegen. Denkbar wäre hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Verwendung der Scherwirkung von Mikropartikeln und der daraus resultierenden Behinderung der Sporenaggregation zur gezielten Steuerung der pilzlichen Morphologie (Antecka et al. 2016; Walisko et al. 2012; Wucherpfennig et al. 2010; Wucherpfennig et al. 2012). Die Beobachtung einer vermehrten Vereinzelnung der Sporen während der untersuchten Kultivierungsbedingungen unterstreicht diese Hypothese.

Nach 36 h konnte durch den Anstieg der Sauerstoffaufnahme bei annähernd gleichbleibender Kohlenstoffdioxidproduktion der Start der Produktion pektinolytischer Enzyme beobachtet werden. In den Prozessen mit 30 g L^{-1} und 35 g L^{-1} wurden während diesem Zeitpunkt höhere Sauerstoffaufnahmeleistungen beobachtet, welche ein Hinweis für eine höhere Biomassekonzentration und Produktivität sind. Dieses charakteristische Verhalten wird in der Literatur als Startsignal einer Umstellung von Biomassewachstum auf Produktion extrazellulärer Metabolite beschrieben (Rodríguez-León et al. 2018).

Nach 48 h kam es zu einer Reaktion auf den akuten Kohlenstoffmangel (*engl. carbon starvation response*). In dieser für den Pilz überlebenswichtigen Phase adaptiert sich die Genregulation hin zu verstärkter Produktion hydrolytischer Enzyme, um mögliche Energiequellen erschließen und somit das Überleben der Art sicherstellen zu können (Nitsche et al. 2012; van Munster et al. 2014). Ab dem Zeitpunkt des Kohlenstoffmangels stieg die sekretierte Proteinmenge und Polygalacturonaseaktivität bis zum Ende der Kultivierung kontinuierlich an.

Im Gegensatz zum Wachstum schien die Proteinproduktion weitestgehend unabhängig von der Konzentration der Zuckerrübenschnitzel im Medium zu sein. Bei 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln als Kohlenstoffquelle war die Polygalacturonaseproduktionsrate und die finale Aktivität am höchsten, weswegen diese Konzentration für alle weitere Untersuchungen verwendet wurde. Allein durch die Umstellung auf Zuckerrübenschnitzel konnte die Polygalacturonaseaktivität von *A. niger* ATCC11414 von $1,9 \text{ U ml}^{-1}$ auf $11,06 \text{ U ml}^{-1}$ und damit um das in etwa sechsfache gesteigert werden.

5.2.2 Variation des pH

Aufgrund der wichtigen Rolle des pH in der Morphogenese während der Kultivierung von *A. niger* sollte der Einfluss auch auf den in dieser Arbeit etablierten Prozess mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat untersucht werden. Hierzu wurden Kultivierungen bei konstantem pH 3, pH 4,5 und pH 6 durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Satzprozess ohne pH-Regelung durchgeführt, um die Auswirkung eines durch den Pilz veränderten pH auf die Produktion pektinolytischer Enzyme zu untersuchen. Basierend auf den zuvor dargestellten Ergebnissen wurde eine Substratkonzentration von 30 g L^{-1} gewählt. Die Prozesse wurden analog zur Beschreibung in Kapitel 4.3.4 durchgeführt. Als Stickstoffquelle wurde in diesen Prozessen 70 mmol L^{-1} Natriumnitrat verwendet. Der pH wurde nach Sterilisation in den Reaktoren auf den Zielwert eingestellt.

Innerhalb der vier Satzprozesse wurde eine Kultivierung ohne aktive pH Regelung durchgeführt. Der während dieses Prozesses aufgezeichnete pH Verlauf ist in Abb. 5.2.4 zu sehen. Zu Beginn dieser Kultivierung lag ein pH von pH 4,7 vor. Nach 12 h Prozesszeit konnte ein Anstieg des pH beobachtet werden, sodass nach 20 h ein pH von 5 erreicht wurde. Anschließend fiel der pH bis zur 36 h auf pH 3 ab und zeigte bis zum Ende der Kultivierung einen leichten Anstieg auf pH 3,3.

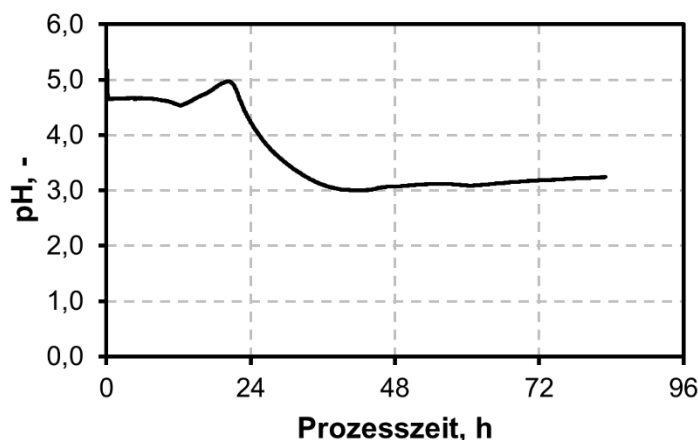


Abb. 5.2.4: pH Verlauf bei der Kultivierung des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 ohne pH Regelung. ($T = 30^\circ\text{C}$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Aufgrund der eingangs dargestellter Abhängigkeit der Morphologie und des Medien pH, wurde die Morphologie während der Kultivierung untersucht (Abb. 5.2.5). Anhand der mit dem Mikroskop vergrößerten Aufnahmen konnten keine deutlichen Unterschiede der Makromorphologie des Pilzes während der Kultivierung bei variiertem pH festgestellt werden.

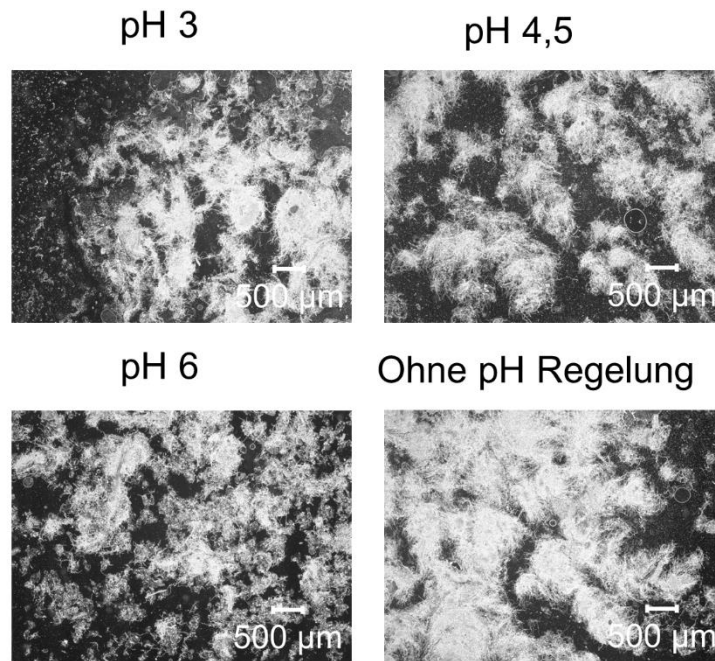


Abb. 5.2.5: Mikroskopische Aufnahmen (48 h) der Kultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von *A. niger* ATCC 11414 aus bei pH 3 (oben links), pH 4,5 (oben rechts), pH 6 (unten links) und ohne pH Regelung (unten rechts). ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}(600 \text{ min}^{-1})$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Auch während der Untersuchung des pH Einflusses wurden die Zuckermonomere im Überstand quantifiziert, um so eine qualitative Aussage über die Sekretion hydrolytischer Enzyme zu erhalten (Abb. 5.2.6). Die freien Zucker Glucose und die Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose und Fructose wurden innerhalb der ersten 19 h nach Start der Kultivierung metabolisiert, wobei eine langsamere Abnahme des Zuckergemischs Xylose, Mannose, Galactose und Fructose im Versuch bei pH 6 beobachtet werden konnte. Kurz vor Erschöpfung von Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose, konnte ein Anstieg der beiden Zuckerkonzentrationen Arabinose und D-Galacturonsäure gemessen werden. Anhand der unterschiedlichen Arabinosekonzentration im Medium während der vier Prozesse konnte ein Einfluss des pH auf die metabolische Aktivität des Pilzes beobachtet werden. Während der Kultivierung bei pH 3, konnte ab 16 h Prozesszeit ein Anstieg bis auf einen Maximalwert von $0,86 \text{ g L}^{-1}$ (40 h) beobachtet werden. Anschließend nahm die Arabinosekonzentration bis 58 h wieder ab und verblieb auf einem konstant niedrigen Niveau bis zum Ende der Kultivierung. Im Versuch bei pH 4,5 stieg die Arabinosekonzentration innerhalb von 8 h auf $0,96 \text{ g L}^{-1}$ (nach 24 h) an und fiel deutlich schneller als bei der Kultivierung bei pH 3 bis zur 58 h ab. Der Prozess bei pH 6 zeigte einen verspäteten Anstieg, bei dem erst nach 34 h eine maximale Arabinosekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ gemessen werden konnte, die ähnlich schnell wie bei pH 5 wieder abnahm. Im Versuch ohne aktive pH-Regelung konnte ab der 23 h ein Anstieg der

Arabinosekonzentration beobachtet werden, die bis zur 64 h wieder abnahm. Dabei wurde eine maximale Konzentration von $1,18 \text{ g L}^{-1}$ gemessen.

Ein Anstieg der D-Galacturonsäurekonzentration konnte zeitgleich zur Zunahme der Arabinosekonzentration beobachtet werden. Jedoch konnte nur in den Prozessen bei pH 4,5 und ohne aktive pH Regelung nennenswerte D-Galacturonsäurekonzentration im Medium nachgewiesen werden. Während dieser Kultivierungen wurde nach 23 h eine Maximalkonzentration von $0,32 \text{ g L}^{-1}$ (pH 4,5) und $0,58 \text{ g L}^{-1}$ (ohne aktive pH-Regelung) gemessen.

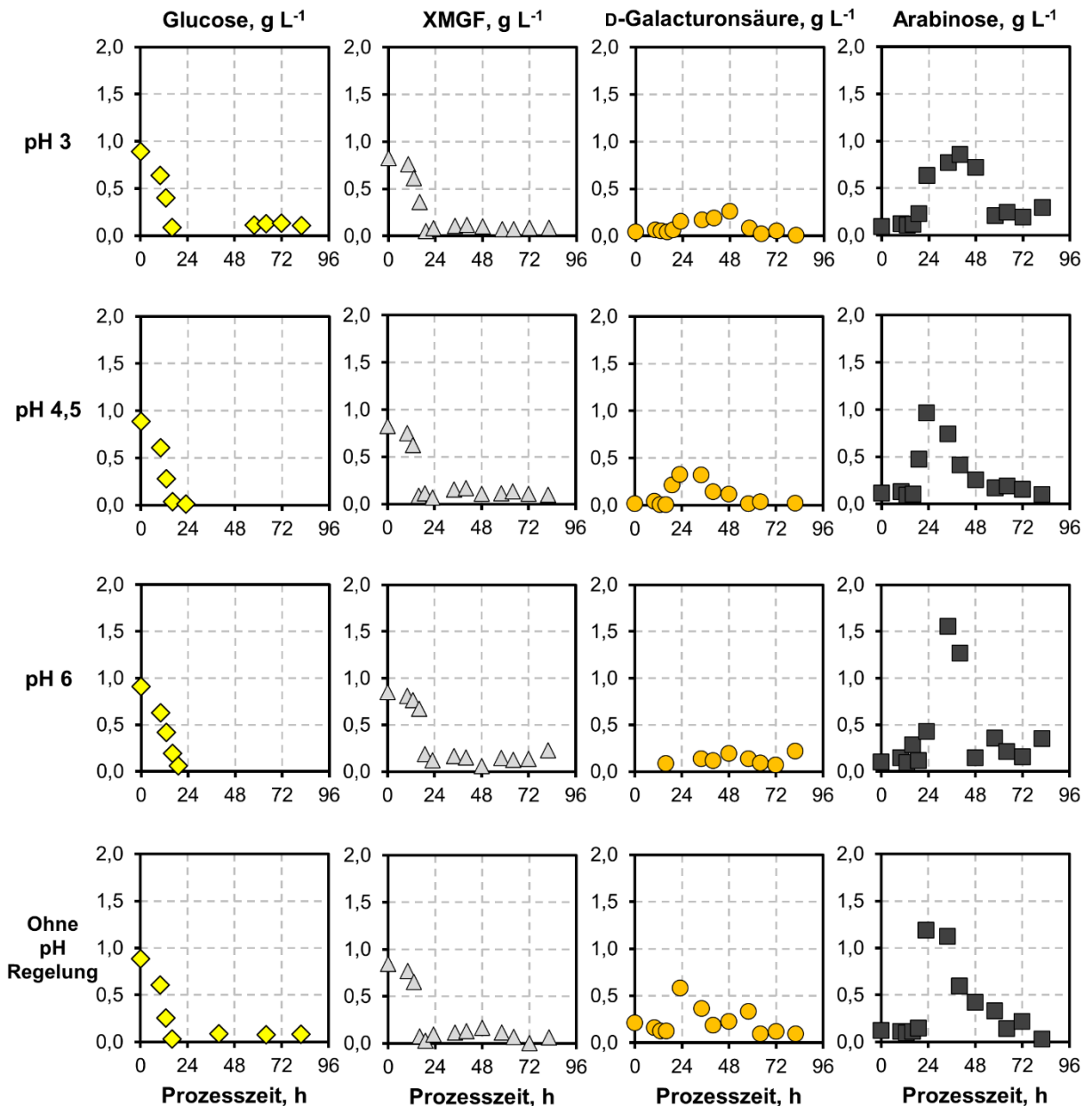


Abb. 5.2.6: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Glucose (◇, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fruktose XMGF (△, hellgrau), D-Galacturonsäure (●, orange) und L-Arabinose (■, dunkelgrau). ($T = 30^\circ\text{C}$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Anhand der in Abb. 5.2.7 dargestellten respiratorischen Aktivitäten konnten Unterschiede während des Wachstums von *A. niger* bei unterschiedlichem pH beobachtet werden. In den Satzprozessen mit pH Regelung bei pH 3 und pH 4,5 und im Versuch ohne aktive pH Regelung wurden in den ersten 24 h ähnliche Kohlenstoffdioxidbildungsraten (CER, carbon dioxide evolution rate) beobachtet. Der Versuch bei pH 6 zeigte in diesem Zeitfenster eine durchweg niedrigere CER. Nach 24 h Prozesszeit konnte in dem Prozess bei pH 4,5 die höchste CER im Vergleich zu allen anderen Prozessen beobachtet werden, die ab der 28 h ihren Maximalwertbereich zwischen 0,5-0,6 mol L⁻¹ h⁻¹ erreichte. Ab der 60 h fiel die CER im Versuch bei pH 4,5 bis zum Ende der Kultivierung auf 0,17 mol L⁻¹ h⁻¹ ab. Dieser charakteristische Verlauf konnte auch in den zuvor beschriebenen Untersuchungen mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat beobachtet werden (vgl. Kapitel 5.2.1). Bei pH 3 und ohne aktive pH-Regelung konnten über die Kultivierung hinweg sehr ähnliche Verläufe der CER beobachtet werden. Dabei durchlief der Versuch ohne aktive pH Regelung charakteristische Kurvenstellen früher als der Versuch bei pH 3. In beide Prozessen zeigte sich ein erstes Maximum (ohne pH Regelung: 41 h 0,7 mol L⁻¹ h⁻¹; pH 3: 44 h 0,6 mol L⁻¹ h⁻¹) gefolgt von einer Abnahme der CER. Ab circa 50 h (ohne pH Regelung) und 60 h (pH 3) konnte ein weiterer Anstieg der CER beobachtet werden, der nach Durchlaufen eines weiteren Maximums (ohne pH Regelung: 62 h - 0,5 mol L⁻¹ h⁻¹; pH 3: 70 h - 0,6 mol L⁻¹ h⁻¹) bis zum Ende der Prozesse abfiel. Analog zum ersten betrachteten Zeitfenster zeigte der Versuch bei pH 6 auch in den folgenden Stunden keinen Anstieg der CER, sodass im gesamten Prozess eine CER von 0,25 mol L⁻¹ h⁻¹ nicht überschritten wurde.

Die Sauerstoffaufnahme (OUR, oxygen uptake rate) zeigten in den Prozessen bei pH 3, pH 6 und ohne aktive pH-Regelung einen sehr ähnlichen Verlauf. Dabei steig sie bis 0,5 mol L⁻¹ h⁻¹ an und verlief auf diesem Niveau konstant bis zum Ende der Prozesse. Ein gänzlich anderes Bild konnte bei der OUR während der Kultivierung bei pH 4,5 beobachtet werden. Von 24 h bis 41 h Prozesszeit konnte ein starker Anstieg auf 1,4 mol L⁻¹ h⁻¹ beobachtet werden. Nach kurzem Abfall wurde ein weiteres Maximum nach 58 h bei 1,3 mol L⁻¹ h⁻¹ durchlaufen. Anschließend verlief die OUR bei circa 1 mol L⁻¹ h⁻¹ bis zum Ende des Prozesses.

Die Proteinkonzentration im Medienüberstand zeigte ebenfalls eine starke Abhängigkeit vom pH während der Kultivierung (Abb. 5.2.7). Schon zu Beginn der Prozesse zeigten sich deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration. Während die Proteinkonzentration in den Prozessen bei pH 3 und pH 4,5 mit 366,88 ± 37,10 mg L⁻¹ und 409,42 ± 15,78 mg L⁻¹ ähnlich hoch waren, wurden in Prozessen bei pH 6 und ohne aktive pH-Regelung (Start pH 4,7) 279,59 ± 8,73 mg L⁻¹ und 219,53 ± 16,06 mg L⁻¹ gemessen. Bis zum Ende der Kultivierung konnte nur im Versuch bei pH 4,5 eine deutliche Steigerung der Proteinkonzentration auf 446,48 ± 28,66 mg L⁻¹ beobachtet werden. In allen anderen Prozessen kam es ab 48 h

entweder zur Stagnation oder sogar zur deutlichen Abnahme der Proteinkonzentration. Ein zur Proteinkonzentration ähnlicher Verlauf konnte bei der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand beobachtet werden (Abb. 5.2.7). Analog zum Anstieg der Proteinkonzentration konnte im Versuch bei pH 4,5 auch ein Anstieg der Polygalacturonaseaktivität beobachtet werden. Dabei wurde nach 82 h eine maximale Aktivität von $11,11 \pm 1,99 \text{ U mL}^{-1}$ gemessen. In allen anderen Prozessen wurde keine Steigerung der Aktivität beobachtet.

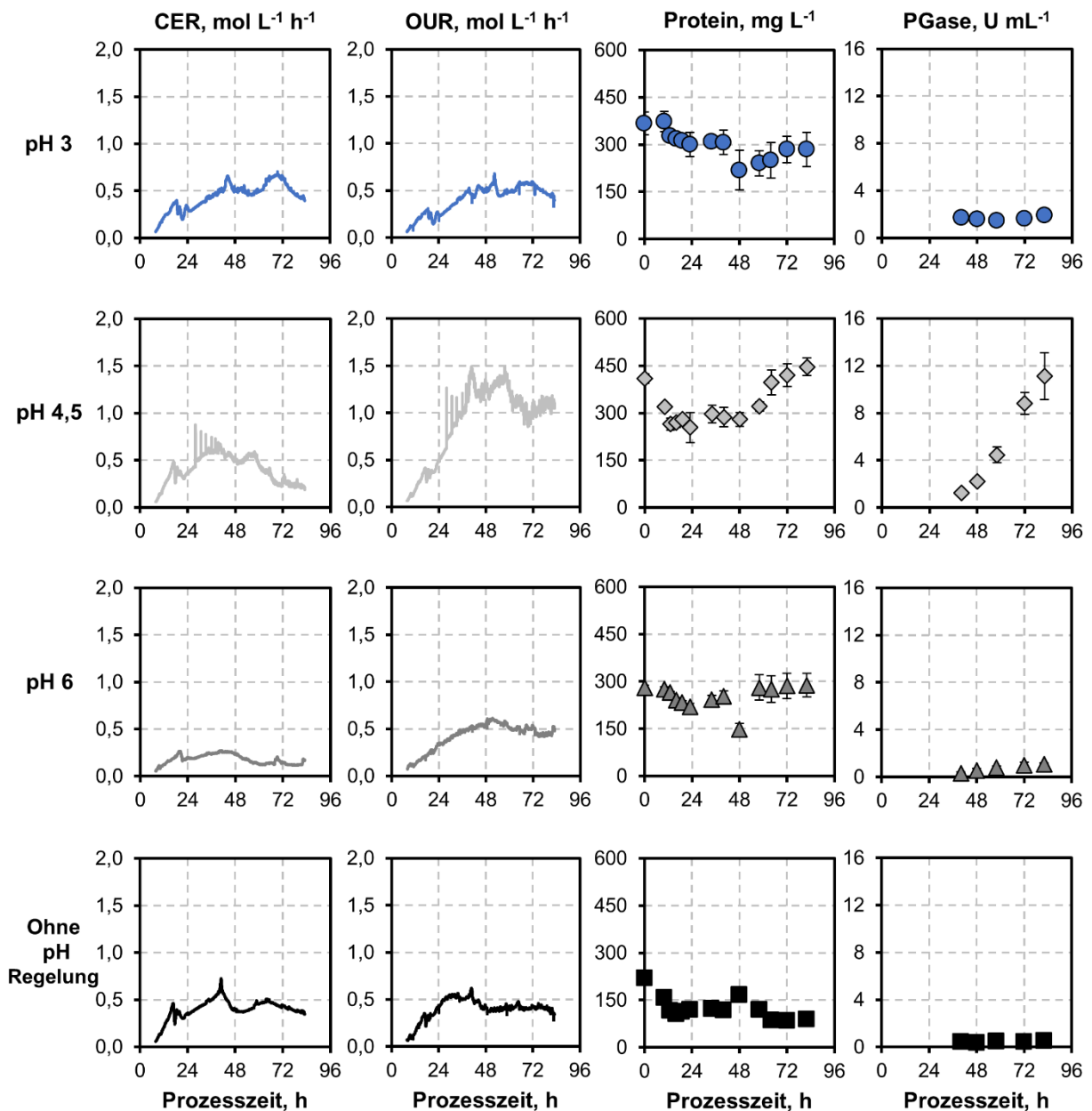


Abb. 5.2.7: Prozessdaten der Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme-rate (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 bei pH 3 (● —, blau), pH 4,5 (◇ —, hellgrau), pH 6 (▲ —, dunkelgrau) und ohne pH Regelung (■ —, schwarz). ($T = 30^\circ\text{C}$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, 10^9 Sporen L^{-1}).

Diskussion

Der Pilz *Aspergillus niger* kann aufgrund seiner hohen pH-Toleranz in einem breiten Bereich von pH 1,4 bis pH 9,8 wachsen (Schuster et al. 2002). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Produktion pektinolytischer Enzyme mit *A. niger* auch in einem weiten pH-Bereich von pH 2,7 - pH 4,5 möglich ist (Acuña-Argüelles et al. 1995; Nair et al. 1995; Reginato et al. 2017; Sandri et al. 2013; Schmidt et al. 1995; Schuster et al. 2002). Der pH spielt dabei eine wichtige Rolle in der initialen Morphogenese der Pilzzellen. Durch die Beeinflussung der Oberflächenladung der Sporen kann er zu unterschiedlichen Morphologieformen während der Kultivierung führen, die die sekretorische Aktivität des Pilzes maßgeblich bestimmt (Grimm et al. 2004; Grimm et al. 2005b). Einen Einfluss des pH auf die Morphologie von *A. niger* konnte während der Untersuchungen nicht bestätigt werden. Dies liegt höchstwahrscheinlich an den zuvor diskutierten Wechselwirkungen der Zuckerrübenschnitzel mit *A. niger*, die damit pH-vermittelte Effekte überlagert haben.

Die Variation des pH während der Kultivierung zeigte einen starken Einfluss auf das Wachstum und die Sekretion pektinolytischer Enzyme von *A. niger*. Die höchste Polygalacturonaseaktivität von $11,11 \pm 1,99 \text{ U mL}^{-1}$ wurde bei der Kultivierung mit pH 4,5 beobachtet. Dieser Versuch zeigte eine deutliche höhere OUR als alle anderen Untersuchungen. Gepaart mit einer zu den anderen Prozessen vergleichbaren CER kann davon ausgegangen werden, dass es während der Kultivierung zu einer deutlich höheren metabolischen Aktivität kam. Dabei wird davon ausgegangen, dass die durch zusätzliche Aufnahme von Sauerstoff generierte Energie in die Synthese der Proteine eingeflossen ist (Rodríguez-León et al. 2018).

In Bezug auf die generierte Polygalacturonaseaktivität zeigten alle anderen Prozesse sehr geringe Aktivitäten. Während der Kultivierung bei pH 6 konnte eine deutliche Wachstumshemmung anhand der CER (50 % geringer als die Vergleichsprozesse) und der Zuckermetabolisierung beobachtet werden. Auch bei Kultivierungen bei pH 3 und ohne pH Regelung deuteten die niedrigen Sauerstoffaufnahmeraten, die langsamere Zuckermetabolisierung sowie die unveränderte Proteinkonzentrationen nach ihren Minima in den zeitlichen Kurven auf ein durch den pH beeinträchtigtes Wachstums- und Sekretionsverhalten hin.

Im Verlauf der Kultivierung ohne pH Regelung konnte ein stoffwechselbedingter pH Abfall beobachtet werden, der auf vom Pilz produzierte und ins Medium sekretierte organische Säuren zurückzuführen ist. Zur Überlebensstrategie des Pilzes gehört unter anderem die Sekretion organischer Säuren und die damit verbundene Ansäuerung des Kultivierungsmediums, um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu unterdrücken. Ein weiterer Vorteil darin ist die Konservierung der Kohlenstoffquelle, da diese organischen Säuren oftmals nur von dem Pilz selbst wieder als Energiequelle genutzt werden können (Kiep 2011).

5.2.3 Variation der Stickstoffquelle

Neben Kohlenstoff und Sauerstoff spielt Stickstoff sowohl bei der Biomassebildung als auch bei der Produktbildung eine entscheidende Rolle. Wichtig bei der Bereitstellung des Stickstoffs in einem Bioprozess ist seine Darreichungsform. Daher wurde der Effekt der fünffach gesteigerten molaren Stickstoffkonzentration der im Standardverfahren verwendeten Stickstoffquelle Natriumnitrat (NN) und der häufig verwendeten Stickstoffquelle Ammoniumsulfat (AS) analysiert. Die Satzprozesse wurden im 1,5 L Parallel-Rührkesselreaktor, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, durchgeführt. Als Substrat wurden 30 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel verwendet.

Zur Bewertung des Wachstums wurde die Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER, carbon dioxide evolution rate) des Pilzes während der Kultivierung verwendet (Abb. 5.2.8). Innerhalb der ersten 10 h konnte kein Unterschied zwischen den vier Satzprozessen beobachtet werden. Bei allen Prozessen konnte nach 12 h das für diese Kultivierungszeit typische Verhalten der CER beobachtet werden, welches in den Prozessen mit Ammoniumsulfat 4 h früher auftrat. Ab 24 h konnte dann eine starke Verlangsamung der CER in den Prozessen mit Natriumnitrat im Vergleich zu den Prozessen mit Ammoniumsulfat gemessen werden. Die maximalen CER von 0,9 mol L⁻¹ h⁻¹ in den Prozessen mit Ammoniumsulfat und 0,6-0,8 mol L⁻¹ h⁻¹ unter Verwendung von Natriumnitrat wurden 36 h nach Prozessstart gemessen. Bis zum Ende der Kultivierung nahmen die CER, wie auch schon in den vorherigen Untersuchungen, ab. Gleichzeitig konnte eine erhöhte CER bei erhöhter Stickstoffkonzentration im Medium beobachtet werden. Die Verläufe der Zuckermonomere im Kultivierungsüberstand deuten auf eine schnellere Zuckeraufnahme in Untersuchungen mit Ammoniumsulfat bei gleichzeitig schnellerem Wachstum hin.

Die Stickstoffquellen Natriumnitrat und Ammoniumsulfat können auch die sekretorische Aktivität des Stammes *A. niger* ATCC11414 beeinflussen. Durch Messung der Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität im Überstand wurde dieser Einfluss untersucht (Abb. 5.2.8). In den ersten 24 h nach Prozessstart wurde eine Abnahme der vornehmlich aus den Zuckerrüben stammenden Proteine beobachtet. Anschließend fand in allen Prozessen ein Anstieg der Proteinkonzentration bis zum Ende der Kultivierung nach 82 h statt. Es wurden finale Proteinkonzentrationen von 305,17 ± 28,76 mg L⁻¹ (70 mM NaNO₃), 249,25 ± 43,27 mg L⁻¹ (350 mM NaNO₃), 298,34 ± 15,39 mg L⁻¹ (35 mM (NH₄)₂SO₄) und 396,64 ± 35,11 mg L⁻¹ (173 mM (NH₄)₂SO₄) erreicht. Im Versuch mit der fünffachen Stickstoffmenge durch Ammoniumsulfat wurde rund 25 % mehr Protein sekretiert als in allen anderen Prozessen. Ammoniumsulfat zeigte einen positiven Effekt auf die Sekretion von Polygalacturonasen. Es wurden bei einfacher und fünffacher Menge an Stickstoff vergleichbare und höhere Aktivitäten erreicht als unter Verwendung von Natriumnitrat (Abb. 5.2.8).

In den Prozessen mit 70 mM und 350 mM Natriumnitrat und 35 mM Ammoniumsulfat nahm die Polygalacturonaseaktivität annähernd linear bis zum Prozessende auf finale Werte von $8,73 \pm 1,58 \text{ U mL}^{-1}$, $5,16 \pm 0,40 \text{ U mL}^{-1}$ und $7,91 \pm 0,82 \text{ U mL}^{-1}$ zu. Während der Kultivierung des Pilzes mit 175 mM Ammoniumsulfat näherte sich die Polygalacturonaseaktivität über die Prozesszeit einem Wert von $19,55 \pm 1,87 \text{ U mL}^{-1}$ an. Dies entsprach einer Aktivitätssteigerung von 48 % im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Prozessen.

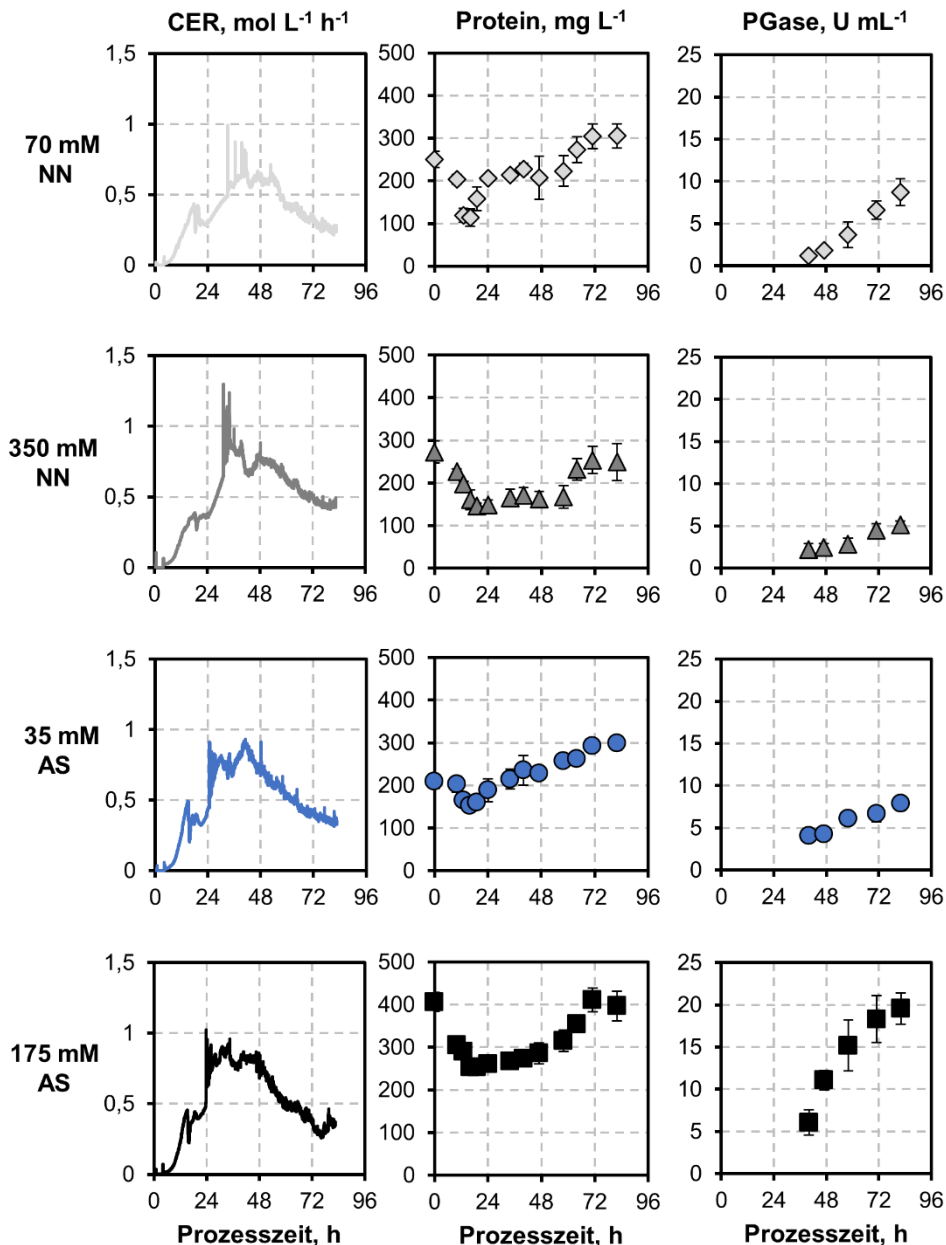


Abb. 5.2.8: Prozessdaten der Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertes Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 mit 70 mM Natriumnitrat (NN, \diamond —, hellgrau), 350 mM Natriumnitrat (NN, \triangle —, dunkelgrau), 35 mM Ammoniumsulfat (AS, \bullet —, blau) und 175 mM Ammoniumsulfat (AS, \blacksquare —, schwarz). ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P \text{ V}^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2$ bis 2 vvm , $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Harnstoff, Ammoniumdihydrogenphosphat und Ammoniumchlorid

Im zweiten Teil der Untersuchung der Stickstoffdarreichungsform wurden weitere Stickstoffquellen untersucht. Dabei fiel die Wahl auf Harnstoff (HS) und die beiden weiteren Ammoniumsalze Ammoniumdihydrogenphosphat (AP) und Ammoniumchlorid (AC).

Da durch die vorangegangenen Ergebnisse eine Prozessverbesserung durch Steigerung der Stickstoffkonzentration beobachtet werden konnte, wurden diese drei genannten Alternativen direkt in der erhöhten Konzentration eingesetzt (350 mM Stickstoff). Analog zu den Untersuchungen zuvor wurden die Satzprozesse im 1,5 L Parallel-Rührkesselreaktor, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, durchgeführt. Als Substrat wurden auch hier 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel verwendet.

Das Wachstumsverhalten wurde wieder über die CER evaluiert (Abb. 5.2.9). Beim Versuch mit Ammoniumdihydrogenphosphat wurden keine Abgasdaten analysiert. In den ersten 16 h nach Inokulation konnte im Versuch mit Harnstoff ein stärkerer Anstieg der CER beobachtet werden als in den Prozessen mit Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat. Ab der 24 h konnte ein schneller Anstieg der CER auf einen Maximalwert um $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der 27 h beobachtet werden. Anschließend konnte analog zu den vorherigen Prozessen mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat eine Abnahme der CER bis zum Ende der Kultivierung beobachtet werden. Der Versuch mit Ammoniumchlorid verlief in den ersten 12 h nahezu identisch zur Referenz mit Ammoniumsulfat. Daran anschließend konnte eine starke Zunahme der CER beobachtet werden, sodass nach etwa 21 h der Maximalwert von $1,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht wurde. Auch in diesem Versuch konnte dann die charakteristische Abnahme bis zum Ende der Kultivierung beobachtet werden.

Nach Analyse der Polygalacturonaseaktivitäten konnten vergleichbare Verläufe wie mit Ammoniumsulfat und Natriumnitrat beobachtet werden (Abb. 5.2.9). Keine der untersuchten Stickstoffquellen hatten einen steigernden Effekt auf die Polygalacturonaseaktivität im Vergleich zu Prozessen mit Ammoniumsulfat. Der Prozess mit Ammoniumchlorid zeigte die niedrigste Aktivität mit $3,17 \pm 0,19 \text{ U mL}^{-1}$. Die Polygalacturonaseaktivität der Prozesse mit Ammoniumdihydrogenphosphat und Harnstoff verlief bis zur 72 h gleich. Anschließend fiel die Polygalacturonaseaktivität im Versuch mit Harnstoff bis zum Ende auf eine finale Aktivität von $5,81 \pm 0,85 \text{ U mL}^{-1}$. Mit Ammoniumdihydrogenphosphat lag die finale Polygalacturonaseaktivität bei $8,89 \pm 0,73 \text{ U mL}^{-1}$.

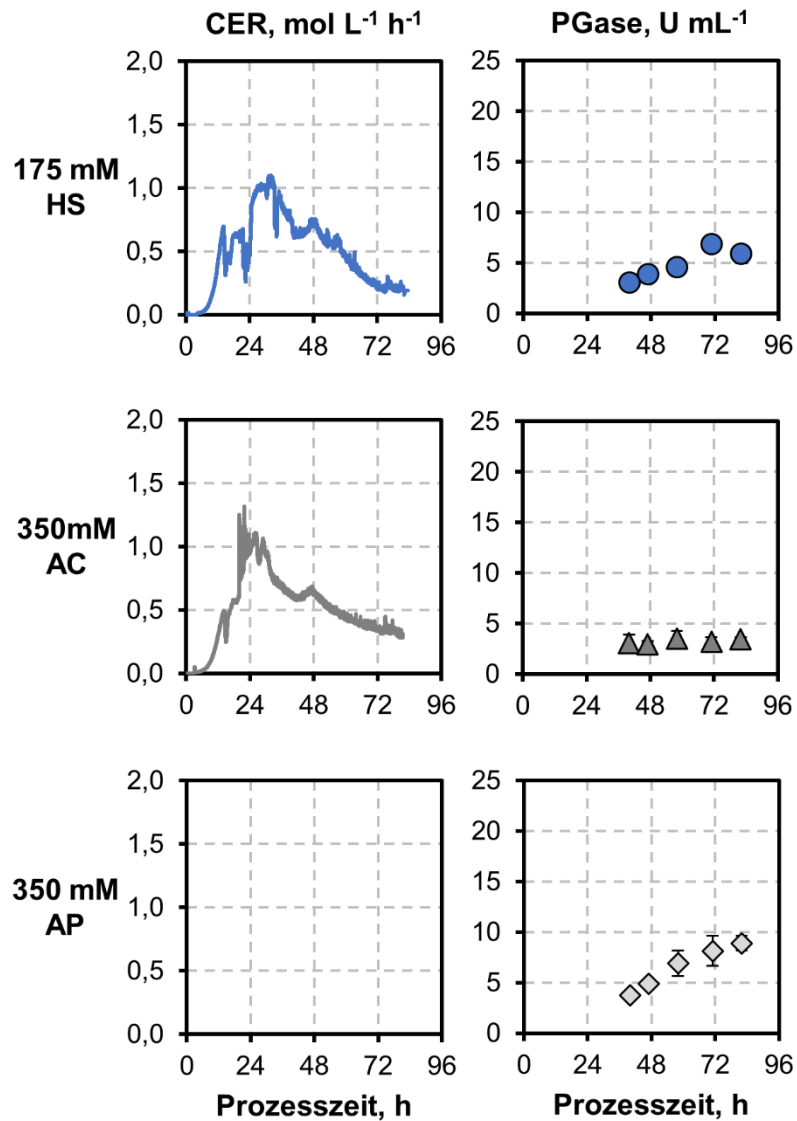


Abb. 5.2.9: Prozessdaten der Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER) und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 mit 175 mM Harnstoff (HS, ● —, blau), 350 mM Ammoniumchlorid (AC, ▲ —, dunkelgrau) und 350 mM Ammoniumdihydrogenphosphat (AP, ◆ —, hellgrau). (T = 30°C, pH 4,5, P V⁻¹ = 3 W L⁻¹ (600 min⁻¹), F_{Luft} = 0,2 bis 2 vvm, V_R = 0,7 L, c_s = 30 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Polygalacturonaseproduktion durch den Einsatz von 175 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle im Vergleich zur zuvor verwendeten Stickstoffquelle Natriumnitrat (70 mM) um 43 % gesteigert werden konnte (Abb. 5.2.10). Alle weiteren eingesetzten Stickstoffquellen zeigten keinen steigernden Effekt auf die Polygalacturonaseaktivität von *A. niger* ATCC 11414.

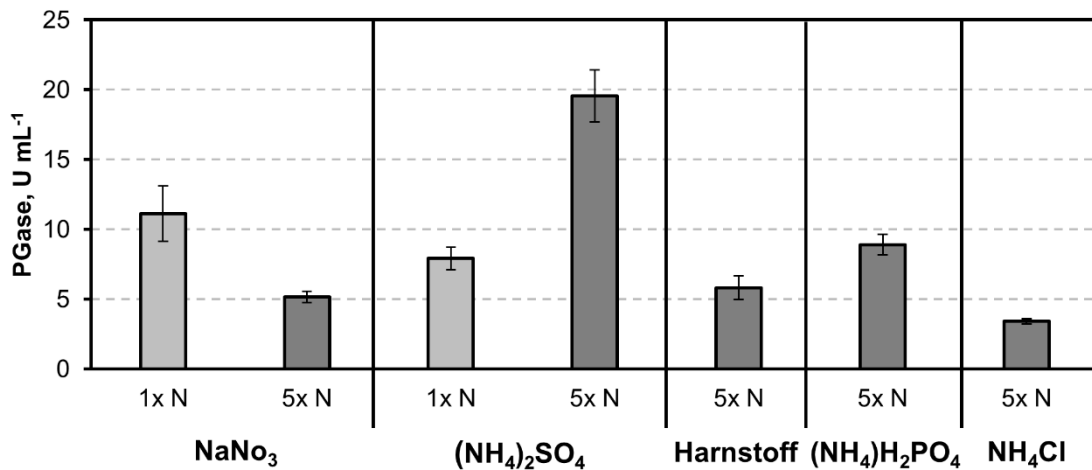


Abb. 5.2.10: Finale Polygalacturonaseaktivität nach Kultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertes Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration. Dargestellt von links nach rechts: Polygalacturonaseaktivität (PGase) im Überstand der finalen Probe nach Kultivierung mit 70 mM Natriumnitrat (1xN), 350 mM Natriumnitrat (5xN), 35 mM Ammoniumsulfat (1xN), 175 mM Ammoniumsulfat (5xN), 175 mM Harnstoff (5xN), 350 mM Ammoniumdihydrogenphosphat (5xN) und 350 mM Ammoniumchlorid (5xN). (T = 30°C, pH 4,5, t = 82 h, P V⁻¹ = 3 W L⁻¹(600 min⁻¹), F_{Luft} = 0,2 bis 2 vvm, V_R = 0,7 L, c_s = 30 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Diskussion

Wie auch der pH hatte die Art der Stickstoffquelle und deren Konzentrationen einen erheblichen Einfluss auf die Polygalacturonaseproduktion von *A. niger*. Die standardmäßig verwendete Stickstoffquelle Natriumnitrat erwies sich weder für das Wachstum noch für die Proteinsekretion als vorteilhaft. Während der Satzkultivierung wurde eine geringere CER, niedrigere Proteinkonzentrationen und niedrigere Polygalacturonaseaktivitäten im Vergleich zur Kultivierung mit Ammoniumsulfat beobachtet. Die Erhöhung der Natriumnitratkonzentration auf die fünffache Stickstoffmenge führte sogar zu einer Verringerung der Polygalacturonaseaktivität.

Mit einer fünffachen Menge an Stickstoff, eingebracht durch Ammoniumsulfat als Stickstofflieferant, konnte die Produktivität von *A. niger* deutlich gesteigert werden. Dabei war eine höhere Respiration bei gleichzeitig höherer Zuckerverstoffwechslungsrate zu beobachten. Außerdem lag nach der Satzkultivierung die höchste beobachtete Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität im Medium vor. Die Proteinsekretion konnte somit um 25 % und die Polygalacturonaseaktivität um 43 % gesteigert werden.

Die Assimilation von Nitrat erfordert die Aktivität der beiden Enzyme Nitratoxidoreduktase und Nitritoxidoreduktase, die das Molekül in Ammonium umwandeln (Campbell & Kinghorn 1990; Cove 1979). Die Zellen müssen für die Synthese dieser Enzyme Energie aufwenden, die dann bei Wachstum und Proteinsynthese von extrazellulären Proteinen fehlt. Die Metabolisierung von Ammonium hingegen ist günstiger und könnte daher zur höheren Ausbeute an sekretiertem Protein geführt haben (Marzluf 1993).

Im Vergleich zu Ammoniumsulfat zeigten die untersuchten Stickstoffquellen Harnstoff, Ammoniumdihydrogenphosphat und Ammoniumchlorid selbst in fünffacher Konzentration niedrigere Enzymaktivitäten. Aufgrund der Unterschiede in der Polygalacturonaseaktivität zwischen Ammoniumsulfat und den anderen Stickstoffquellen lässt sich auf ein durch die Stickstoffquelle und deren Gegenion beeinflusstes Sekretionsverhalten schließen. Zusätzlich kann durch Einsatz gleicher Stickstoffkonzentrationen in den Versuchen eine Stickstoffunterversorgung als Grund für die niedrigeren Polygalacturonaseaktivitäten als unwahrscheinlich eingestuft werden.

Ausgehend von Ammonium als Grund für die gesteigerte Polygalacturonaseaktivität, wurde ein ähnlicher Einfluss der beiden anderen untersuchten Ammoniumverbindungen antizipiert. Diese Hypothese konnte jedoch anhand der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Aufgrund der niedrigen Aktivitäten lag die Vermutung nahe, dass das mit Ammoniumsulfat eingebrachte Sulfat einen positiven Effekt auf Biomassewachstum und Proteinsekretion hat, zumal es auch eine zentrale Rolle in der Aminosäuresynthese spielt (Marzluf 1993).

Makromorphologisch waren auch in diesen Prozessen keine Unterschiede in der Morphologie zu erkennen, was bedeutet, dass der morphologiebeeinflussende Effekt der Zuckerrübenschnitzel mögliche Einflüsse von pH und Stickstoffquelle überlagert.

Neben definierten Stickstoffquellen kommen oft organische Stickstoffquellen wie Malzextrakt, oder Pepton aufgrund ihres positiven Effekts auf die Proteinproduktion verschiedener Aspergilli zum Einsatz (Ketipally & Ram 2018; Puri et al. 2005; Reginatto et al. 2017; Sandri et al. 2013). Die Anwesenheit von stimulierenden Wachstumsfaktoren, Proteinen und Aminosäuren in diesen Substanzen könnte für den Stoffwechsel der Zellen vorteilhaft sein. Aufgrund des natürlichen Ursprungs variieren die verschiedenen Chargen organischer Stickstoffquellen jedoch in ihrer Zusammensetzung. Da Zuckerrübenschnitzel bereits durch eine unterschiedliche Zusammensetzung in Abhängigkeit von Erntejahr und Gebiet gekennzeichnet sind (Kracher et al. 2014), wurde von der Verwendung und Untersuchung des Einfluss von Stickstoffquellen organischen Ursprungs abgesehen, um durch eine höhere Prozessstabilisierung die bestmögliche Skalierbarkeit des Prozesses zu ermöglichen.

5.2.4 Variation der Inokulationskonzentration

Die Inokulationskonzentration spielt eine zentrale Rolle während des initialen Wachstums und der anschließenden Produktbildung von *A. niger*. Daher wurden Inokulationskonzentrationen von 10^7 , 10^8 und 10^9 Sporen L^{-1} untersucht. Die Prozesse wurden im 1,5 L Parallel-Rührkesselreaktor wie in Kapitel 4.3.4 beschreiben durchgeführt. Als Stickstoffquelle wurde aufgrund der vorherigen Ergebnisse $175 \text{ mmol } L^{-1}$ Ammoniumsulfat verwendet.

Die Konzentrationsverläufe der freien Zuckermonomere im Medium sind in Abb. 5.2.11 dargestellt. Je höher die Inokulationskonzentration, desto schneller nahm die Konzentration der frei im Medium verfügbaren Zucker Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose ab. Das Maximum der freien Arabinose trat, je nach Inokulationskonzentration, zu unterschiedlichen Prozesszeitpunkten auf. Am frühesten wurde es bei einer Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} beobachtet. Dabei wurde nach 24 h eine maximale Arabinosekonzentration von $0,65 \text{ g } L^{-1}$ gemessen. Mit einer Verzögerung von 9 h wurde eine maximale Arabinosekonzentration von $0,64 \text{ g } L^{-1}$ im Versuch mit 10^8 Sporen L^{-1} nach 33 h gemessen. Im Versuch mit der niedrigsten Inokulationsdichte von 10^7 Sporen L^{-1} wurde die maximale Arabinosekonzentration von $0,98 \text{ g } L^{-1}$ erst nach 41 h beobachtet. Im Vergleich zur Referenz bei 10^9 Sporen L^{-1} war dies eine Verzögerung um 17 h.

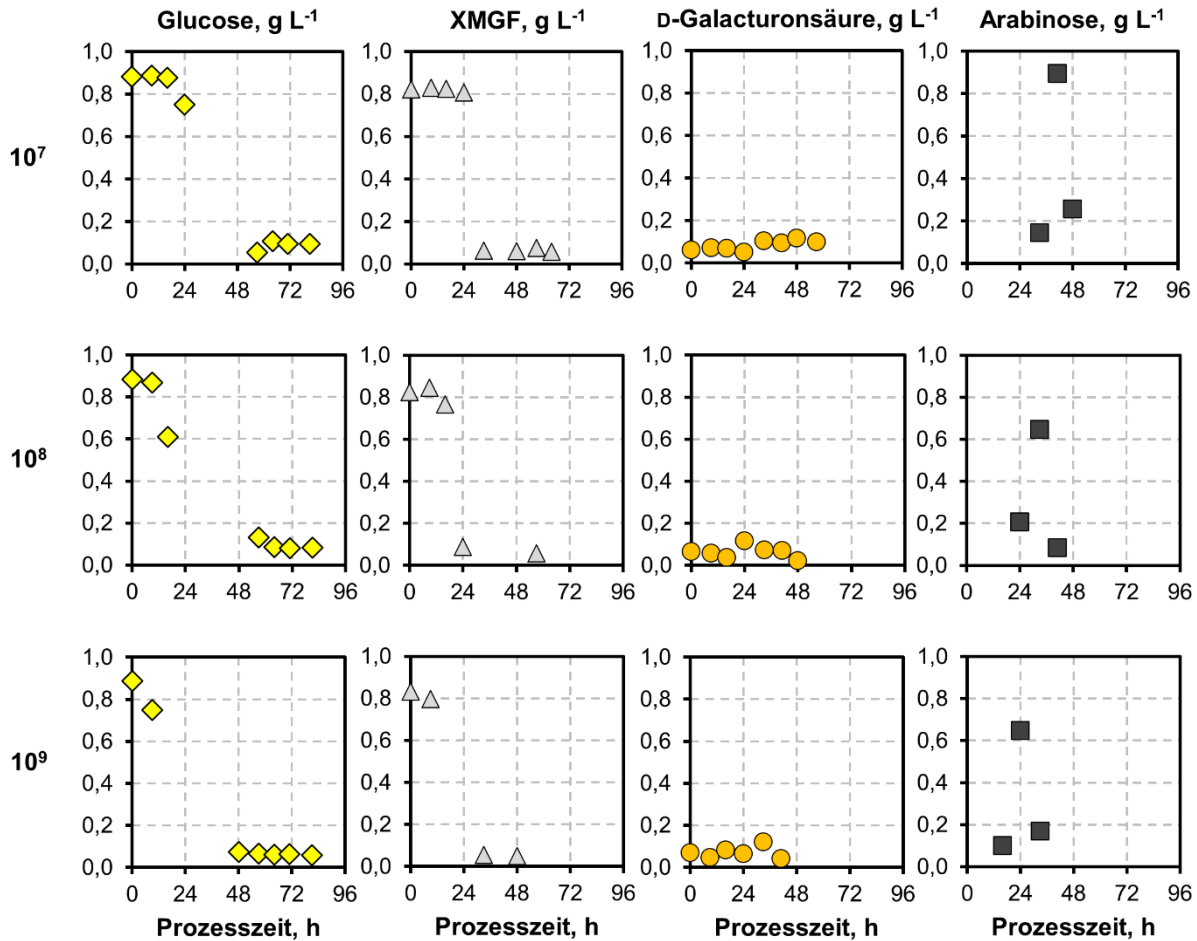


Abb. 5.2.11 Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiert Inokulationskonzentration. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Glucose (◇, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fructose XMGF (△, hellgrau), D-Galacturonsäure (●, orange) und L-Arabinose (■, dunkelgrau). ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2$ bis 2 vvm , $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

Das Wachstum von *A. niger* in Satzprozessen mit unterschiedlicher initialer Sporenkonzentration wurde anhand der respiratorischen Aktivität verglichen (Abb. 5.2.12). Während der Kultivierung mit variiert Inokulationskonzentration konnte in allen drei Prozessen ein ähnlicher Kurvenverlauf der respiratorischen Raten mit einem durch die Inokulationskonzentration bedingten, zeitlichen Versatz beobachtet werden. Bei einer initialen Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} wurde nach 30 h eine maximale Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER, carbon dioxide evolution rate) von $0,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beobachtet. Während der Kultivierung mit niedrigeren Inokulationskonzentrationen von 10^8 Sporen L^{-1} und 10^7 Sporen L^{-1} wurden nach 37 h und 48 h maximale CER von $0,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die Sauerstoffaufnahme rate der drei Prozesse zeigte eine ähnliche Staffelung mit Maximalwerten von $1,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (10^9 Sporen L^{-1}), $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (10^8 Sporen L^{-1}) und $1,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (10^7 Sporen L^{-1}).

Um einen Effekt auf die Proteinsekretion zu sehen, wurde die Proteinmenge im Medium bestimmt (Abb. 5.2.12). In den ersten 48 h war eine Abnahme der Proteinkonzentration in allen Prozessen zu erkennen. Anschließend konnte eine Zunahme der Proteinkonzentration beobachtet werden bis auf vergleichbare Endwerte von $640,16 \pm 1,03 \text{ mg L}^{-1}$ (10^9), $632,03 \pm 8,28 \text{ mg L}^{-1}$ (10^8) und $599,08 \pm 60,93 \text{ mg L}^{-1}$ (10^7). Je geringer die Inokulationskonzentration war, desto stärker war die Proteinzunahme ab der 48 h bis zum Ende der Kultivierung.

Die in Abb. 5.2.12 dargestellten Polygalacturonaseaktivitäten im Verlauf der Kultivierungen hingegen zeigten einen deutlichen Einfluss der Inokulationskonzentration. In den Prozessen mit einer Inokulationskonzentration von 10^7 Sporen L^{-1} und 10^8 Sporen L^{-1} konnte ab 48 h ein Anstieg der Polygalacturonaseaktivität bis auf $14,88 \pm 1,79 \text{ U mL}^{-1}$ und $13,22 \pm 0,97 \text{ U mL}^{-1}$ nach 81 h beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte mit der Referenzkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} schon ab der 41 h ein Anstieg der Polygalacturonaseaktivität verzeichnet werden. Nach 57 h wurde mit 14 U mL^{-1} die Maximalkonzentration der beiden anderen Sporenkonzentrationen bereits überschritten. Am Ende der Kultivierung konnte eine maximale Aktivität von $22,64 \pm 3,00 \text{ U mL}^{-1}$ gemessen werden. Mit einer Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} nach Inokulation konnte damit eine um rund 35 % höhere Polygalacturonaseaktivität erreicht werden, als bei der Verwendung niedrigerer Inokulationskonzentrationen.

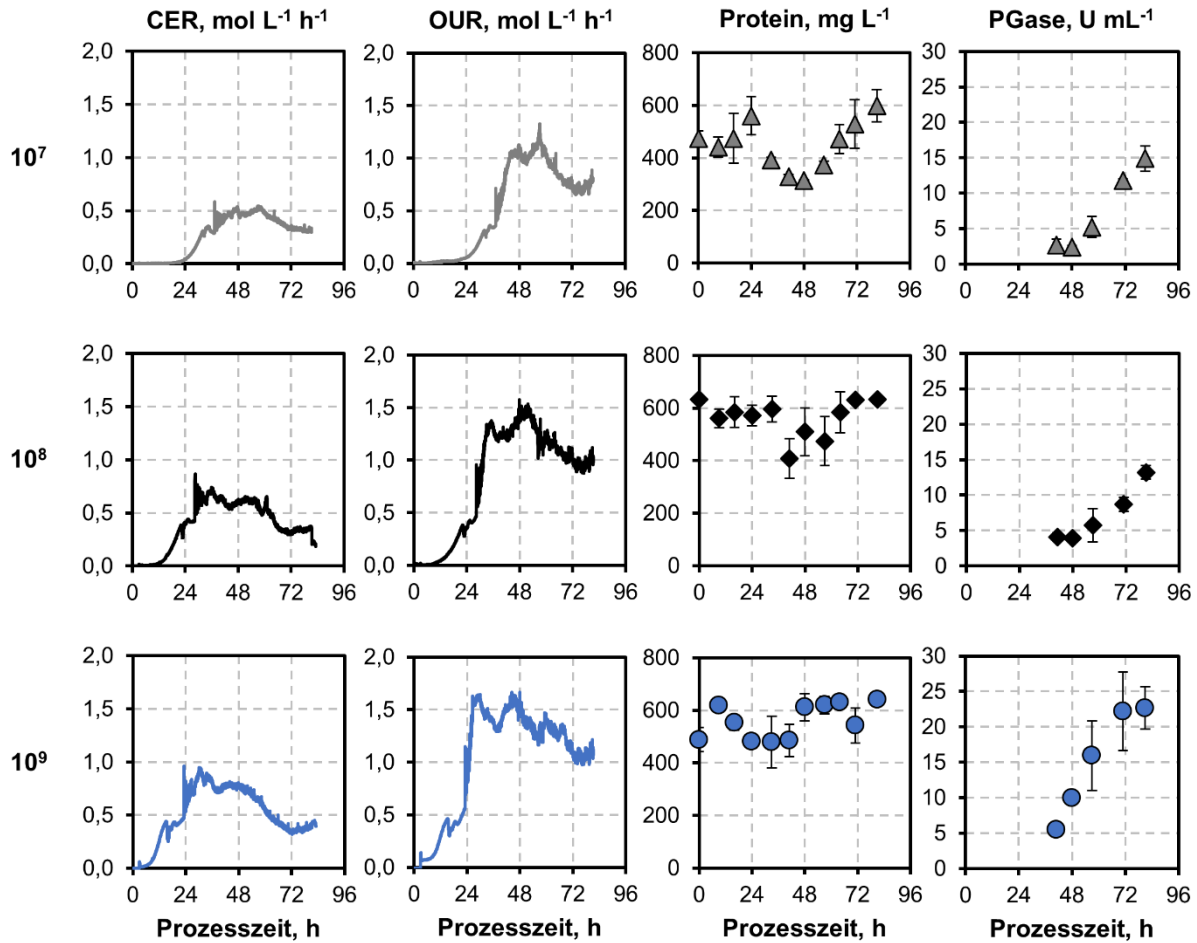


Abb. 5.2.12: Prozessdaten der Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Inokulationskonzentration. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* ATCC 11414 bei einer Inokulationsdichte von 10^7 Sporen L^{-1} (Δ —, dunkelgrau), 10^8 Sporen L^{-1} (\blacksquare —, schwarz) und 10^9 Sporen L^{-1} (\bullet —, blau) zu Beginn des Prozesses. ($T = 30^\circ C$, $pH = 4,5$, $P V^{-1} = 3 W L^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{Luft} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 L$, $c_s = 30 g L^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

Diskussion

Sowohl das Wachstum als auch die sekretorische Aktivität des Pilzes zeigten eine starke Abhängigkeit von den Sporenkonzentrationen bei der Inokulation. Untersucht wurden die Inokulationskonzentrationen 10^7 , 10^8 und 10^9 Sporen L^{-1} , da dieser Konzentrationsbereich in der Literatur als optimal für die Produktivität verschiedener Produkte beschrieben wird (Friedrich et al. 1990; Kiep 2011). Bei sehr hohen Inokulationsdichten ($>10^9$ Sporen L^{-1}) kommt es zu negativen Effekten auf das Auskeimungsverhalten der Sporen und damit auch auf das Wachstum des Mikroorganismus. Dieses Phänomen beruht auf einer Autoregulation des Populationslevels durch Quorum Sensing. Quorum Sensing ist ein Mechanismus, der es Zellen erlaubt, über die Konzentration bestimmter Botenstoffe im Medium die eigene Populationsdichte ermitteln und regulieren zu können. Beispielsweise fungieren die Botenstoffe als eine

Art Inhibitor und beeinflussen das Auskeimen der Sporen (Padder et al. 2018). Einige Mikroorganismen, darunter auch *A. niger*, sind sensitiv für Botenstoffe wie Farnesol, Tyrosol, Octenol oder α -(1,3)-glucan, die bereits in nanomolaren Konzentrationen Wirkung zeigen (Barrios-Gonzalez et al. 1989; Chitarra et al. 2004; Hobot & Gull 1980; Hogan 2006).

Ein weiterer Modulator des Auskeimungsverhalten von *A. niger* Sporen ist die im Medium gelöste CO_2 -Konzentration. Es wurde gezeigt, dass bereits bei einer CO_2 -Konzentration von 0,5 % im Medium zwischen 70-90 % der Sporen erfolgreich auskeimen (Vakil et al. 1961). Bei geringerer Konzentration verringert sich die Auskeimungsquote, sodass bei 0,04 % CO_2 (Luftsättigung) nur rund 15-20 % der Sporen auskeimen (Vakil et al. 1961).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten anhand der respiratorischen Aktivität sowie der Abnahme der frei verfügbaren Zucker im Medium, dass die Verringerung der Sporenkonzentration zu einer Verzögerung des Wachstums führt. Bei einer Reduktion der Inokulationskonzentration um 90 % wurde die maximale Respiration erst rund 6 h später erreicht. Bei einer Reduktion auf 1 %, verzögerte sich der Prozess sogar um 18 h. Zusätzlich zum zeitlichen Effekt verringerten sich auch die maximalen respiratorischen Raten bei niedrigeren Inokulationskonzentrationen. Makromorphologisch hingegen wurden durch die Verringerung der Sporenkonzentration keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Neben der höheren, aber dennoch nicht hemmenden Sporenkonzentration können die beobachteten Unterschiede in der Wachstumsrate somit auch durch die unterschiedliche CO_2 -Konzentration im Medium hervorgerufen worden sein, die als positiver Verstärker der Auskeimung fungiert. Die für die Auskeimung als optimal beschriebene Konzentration von 0,5 % wurde mit der Inokulationsdichten 10^9 Sporen L^{-1} 19 h oder 29 h früher durchschritten als in Prozessen mit den niedrigeren Inokulationsdichten von 10^7 Sporen L^{-1} und 10^8 Sporen L^{-1} . Durch die Verringerung der Inokulationsdichte verringerte sich die Sekretionsgeschwindigkeit der Polygalacturonaseaktivität und damit auch die maximal erzeugte Enzymmenge innerhalb der untersuchten Prozesszeit. Insgesamt konnte die standardmäßig verwendete Konzentration von 10^9 Sporen L^{-1} aufgrund der höchsten Polygalacturonaseaktivität für alle weiteren Untersuchungen als Startwert verifiziert werden.

5.3 Charakterisierung rekombinanter *A. niger* Stämme zur Polygalacturonaseherstellung

Von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft (Technische Universität München, Prof. Dr. J. Philipp Benz) wurden sechs rekombinante *A. niger* Stämme bereitgestellt, die verschiedene genetische Veränderungen zeigten, um die pektinolytische Aktivität zu erhöhen und damit die Ausbeute freier Zuckermonomere nach der Hydrolyse zu steigern (siehe Tabelle 4.1.2).

5.3.1 Genetische Vorbereitung des Basisstammes *A. niger* ATCC 11414

Der als Ausgangsstamm für die genetische Modifikation fungierende Stamm *A. niger* aKS039 wurde mit dem Wildtyp-Basisstamm *A. niger* ATCC 11414 (parentaler Stamm zu *A. niger* aKS039) verglichen, um zu prüfen, ob die zur Vorbereitung eingebrachten genetischen Veränderungen in den Stamm *A. niger* ATCC 11414 das Wachstum und Produktbildung beeinflussen. Hierzu wurden beide Stämme im kontrollierten Rührkesselreaktor unter Verwendung des standardisierten Satzverfahrens mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln charakterisiert (Kapitel 4.3.4). Aufgrund der induzierten Uridin- und Nicotinamid-Auxotrophie wurde dem Medium 1 mmol L^{-1} Uridin hinzugefügt.

Die für die Sekretionsaktivität entscheidende Morphologie wurde in beiden Prozessen untersucht (Abb. 5.3.1). Anhand der mikroskopischen Aufnahmen konnten keine sichtbaren, auf die genetische Modifikation zurückzuführenden, Veränderungen der pilzlichen Morphologie festgestellt werden.

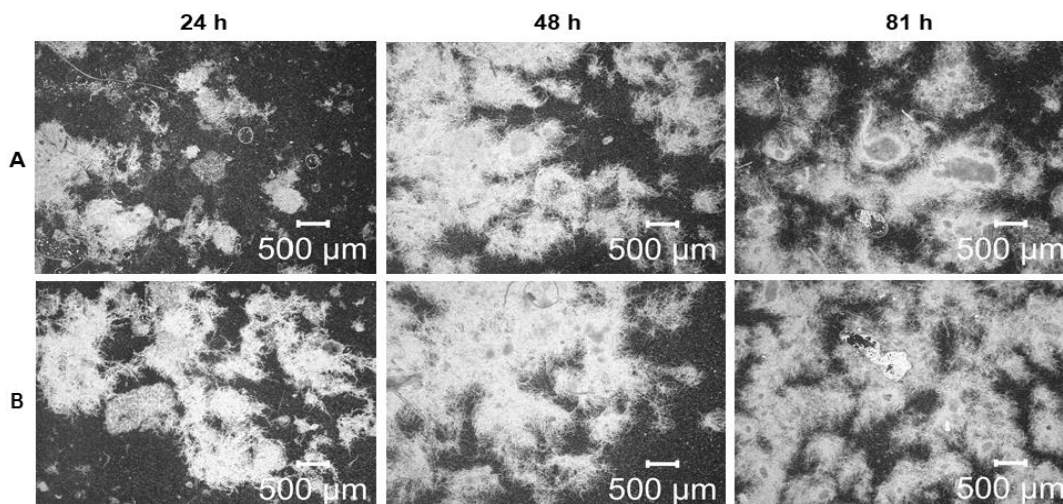


Abb. 5.3.1: Mikroskopische Aufnahmen bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstammes ATCC 11414 und des rekombinanten *A. niger* Stammes aKS039. A: ATCC 11414; B: aKS039 ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}(600 \text{ min}^{-1})$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Die Konzentration der Hauptzucker im Medium zeigten in beiden Satzprozesse vergleichbare Verläufe. Der aus den vorherigen Untersuchungen bekannte Verlauf konnte auch hier beobachtet werden (vgl. Kapitel 5.2). Zu Beginn der Kultivierung wurden die Zucker Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose aufgenommen, gefolgt von einer Freisetzung und Metabolisierung der Arabinose. Die D-Galacturonsäurekonzentration blieb während der gesamten Kultivierungszeit auf einem niedrigen, an der unteren Detektionsgrenze verlaufenden, Niveau (Abb. 5.3.2).

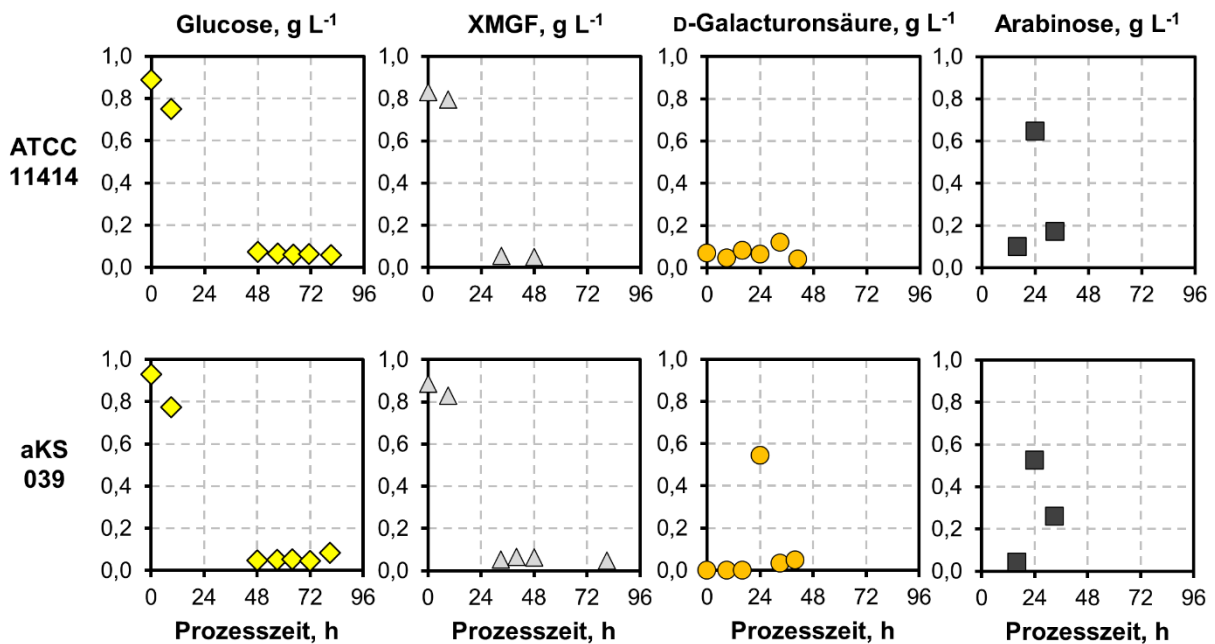


Abb. 5.3.2: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basisstamms ATCC 11414 und des rekombinanten *A. niger* Stammes aKS039. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Glucose (◇, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fructose XMGF (△, hellgrau), D-Galacturonsäure (●, orange) und L-Arabinose (■, dunkelgrau). ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Zur Beschreibung des Wachstums wurde die respiratorische Aktivität in Form der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER, carbon dioxide evolution rate) und der Sauerstoffaufnahme (OUR, oxygen uptake rate) aus den Analysen der Abgaszusammensetzung berechnet (Abb. 5.3.3). Im Verlauf von CER und OUR konnten keine signifikante Unterschiede zwischen dem Basisstamm *A. niger* ATCC 11414 und dem *A. niger* Stamm aKS039 erkannt werden (Abb. 5.3.3). Bei den Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand konnten jedoch Unterschiede zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden (Abb. 5.3.3). Zwar konnte ein ähnlicher Konzentrationsverlauf bei beiden Stämmen beobachtet werden, jedoch wurde von *A. niger* aKS039 rund 50% weniger Protein produziert im Vergleich zu *A. niger* ATCC 11414. Zum Ende der Kultivierung, dem Zeitpunkt an dem vornehmlich durch den Pilz produziert Protein vorliegen sollte, konnte *A. niger* aKS039 rund $342 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ und *A. niger* ATCC 11414 rund

$640 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ Protein im Kulturüberstand erreichen. Die Untersuchung der Polygalacturona-seaktivität zeigte dagegen, ausgenommen von unterschiedlichen Aktivitäten zu Beginn der Kultivierung, sehr ähnliche finale Polygalacturonaseaktivitäten. Der Stamm *A. niger* aKS039 konnte mit $23,06 \pm 1,53 \text{ U mL}^{-1}$ eine vergleichbare Aktivität wie *A. niger* ATCC 11414 ($22,64 \pm 3 \text{ U mL}^{-1}$) erzeugen.

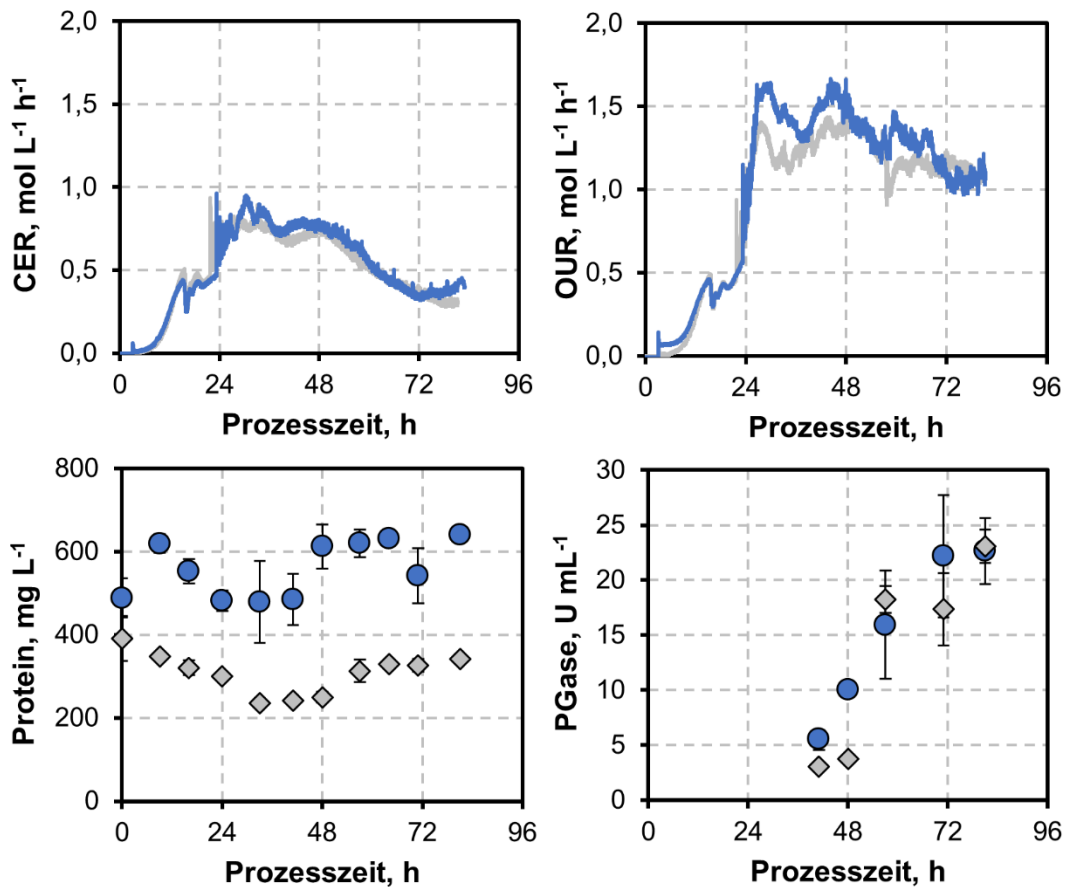


Abb. 5.3.3: Prozessdaten der Kultivierungen des *A. niger* Basisstammes ATCC 11414 und des rekombinanten *A. niger* Stammes aKS039. Dargestellt ist der Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) von *A. niger* ATCC 11414 (●, —, blau), aKS039 (◇, —, hellgrau). ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1} (600 \text{ min}^{-1})$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

Diskussion

Insgesamt wurden drei genetische Modifikationen des Wildtyp-Basisstammes *A. niger* ATCC 11414 durchgeführt, um diesen für weitere genetische Modifikationen zur Steigerung der pektinolytischen Aktivität vorzubereiten. Hierzu wurde das *kusA* Gen des nicht homologen Reparaturmechanismus „Non-homologous end-joining (NHEJ)“ disruptiert, um die homologe Rekombination zu begünstigen. Außerdem wurde mit *pyrG* und der dadurch induzierten Uridin Auxotrophie ein Gegenselektionswerkzeug für die CRISPR/Cas-Methode zur genetischen Veränderung in den Basisstamm integriert. Als dritte Vorbereitung wurde mit der Ausschaltung des *nicB* Gens, welches für eine Nicotinamidnukleotid-Adenylyltransferase codiert, ein weiterer Auxotrophiemarker eingefügt.

Durch die Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die genannten genetische Veränderungen des Basisstammes *A. niger* ATCC 11414 hin zu *A. niger* aKS039 keine Beeinträchtigung des Pilzes bezüglich des Wachstums, der Morphologie und der Sekretion von Polygalacturonase zur Folge hatte.

Nach Vergleich der Zuckerkonzentrationen im Medienüberstand lässt sich qualitativ auf ähnliche hydrolytische Eigenschaften beider Stämme schließen. Wie aus zuvor durchgeführten Untersuchungen bekannt (vgl. Kapitel 5.1 und 5.2), konnte keine Korrelation zwischen sekretiertem Protein und Polygalacturonaseaktivität beobachtet werden. Signifikante Unterschiede konnten nur in der sekretierten Proteinmenge festgestellt werden.

5.3.2 Charakterisierung rekombinanter *A. niger* Stämme

Aufbauend auf den Versuchsergebnissen des rekombinanten Basisstamms *A. niger* aKS039 sollten im nächsten Schritt vier rekombinante Stämme mit verbesserten pektinolytischen Eigenschaften untersucht werden. Bei dieser Untersuchung stand die Identifikation des Stammes mit der höchsten Produktion pektinolytischer Enzyme im Mittelpunkt.

Bei *A. niger* aKS055 (Δ gaaX) war der transkriptionelle Repressor GaaX deletiert. Durch die Bindung von GaaX an den transkriptionellen Aktivator GaaR wird die Expression bestimmter Gene verhindert, die für die Produktion pektinolytischer Enzyme codieren, sodass eine konstitutive Produktion pektinolytischer Enzyme möglich wird. Der *A. niger* Stamm aKS056 (Δ racA) weist eine Deletion des *racA* Gens auf, durch welche es zu einer erhöhten Hyphenverzweigung kommt. Dieses sogenannte „Hyperbranching“ hat eine Vergrößerung der Myceloberfläche, insbesondere eine zahlenmäßige Zunahme der Hyphenspitzen, zur Folge, welche als sekretionssteigernd angenommen wird. Der dritte *A. niger* Stamm aKS057 (Δ creA) weist eine Deletion des Repressors CreA auf. Dieser gilt als Mediator der Kohlenstoffkatabolitrepression und blockiert die Genexpression lytischer Enzyme, sofern präferierte Kohlenstoffquellen, wie freie Monosaccharide (insbesondere Glucose) im Medium zur Verfügung stehen. Beim *A. niger* Stamm aKS058 (Δ prtT) lag eine Deletion des positiven Transkriptionsfaktors PrtT vor, der die Sekretion von Proteasen reduzieren soll, um einen möglichen Abbau der sekretierten pektinolytischen Enzyme im Überstand zu reduzieren.

Zur Charakterisierung der Polygalacturonaseproduktion wurden diese vier *A. niger* Stämme im Rührkesselreaktor verglichen. Die Kultivierung wurde wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben durchgeführt. Die *A. niger* Stämme aKS055, aKS057 und aKS058 wurden, wie im Standardverfahren festgelegt und durch vorangegangene Untersuchungen bestätigt, mit einer initialen Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} inokuliert. Bei *A. niger* aKS056 konnte der Versuch aufgrund geringerer Sporenbildung auf den Vorkulturplatten nur mit einer Konzentration von $1,26 \times 10^8$ Sporen L^{-1} inokuliert werden (entspricht 12.6 % der normalen Inokulationsmenge). Auch in diesen Prozessen wurde dem Medium aufgrund der Uridin-Auxotrophie $1 \text{ mmol } L^{-1}$ Uridin hinzugefügt.

Konzentrations-Zeitverläufe der Zuckermonomere zeigten mit der respiratorischen Aktivität übereinstimmende Unterschiede (Abb. 5.3.4 & Abb. 5.3.5). Wie anhand der respiratorischen Daten zu erkennen ist, konnte die verzögerte Abnahme der Glucose- sowie Xylose-, Mannose-, Galactose- und Fruktosekonzentration als Indikator für langsameres Wachstum der beiden *A. niger* Stämmen aKS056 und aKS057 beobachtet werden. Auch die Freisetzung und Metabolisierung der Arabinosefraktion innerhalb der Zuckerrübenschnitzel war unterschiedlich stark ausgeprägt, sodass sich die maximal gemessenen Konzentrationen

im Mediumüberstand stark unterschieden (aKS055: 0.86 g L^{-1} , aKS056: 1.49 g L^{-1} , aKS057: 1.70 g L^{-1} , aKS058: 1.01 g L^{-1}). Die D-Galacturonsäurekonzentrationen waren aufgrund ihrer Verstoffwechslung niedrig. Nach 48 h konnten keine Zuckermonomere im Medium bestimmt werden, sodass davon auszugehen ist, dass die freigesetzten Zucker schnell aufgenommen und verstoffwechselt wurden und dass die Kohlenstoffquelle langsamer und bis zu einem gewissen Grad vollständig hydrolysiert wurde.

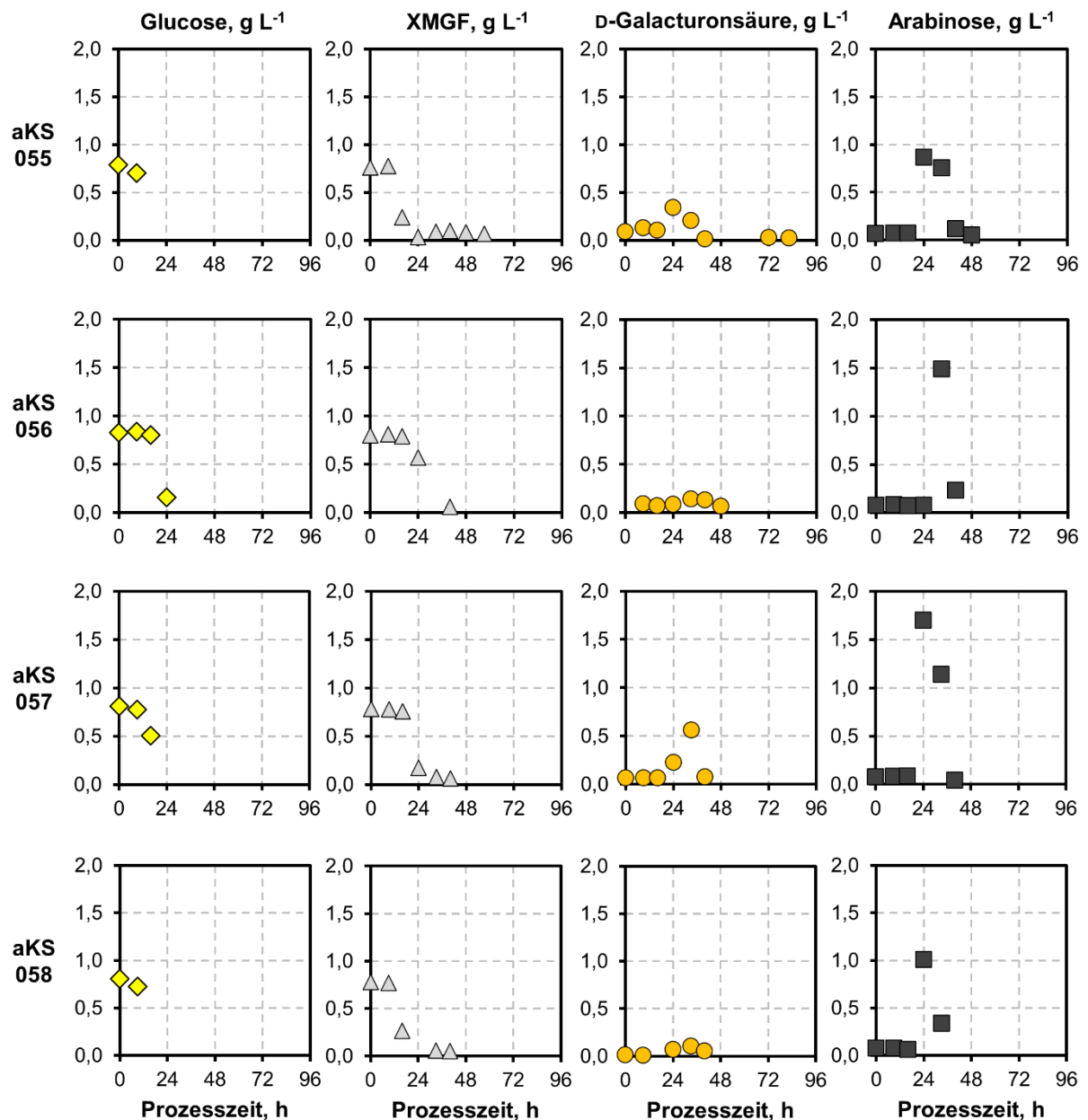


Abb. 5.3.4: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen mit den rekombinanten *A. niger* Stämmen aKS055 bis aKS058. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Glucose (\diamond , gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fructose XMGF (\triangle , hellgrau), D-Galacturonsäure (\circ , orange) und L-Arabinose (\blacksquare , dunkelgrau). ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2$ bis 2 vvm , $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

Um die sekretorische Kapazität und die Produktion pektinolytischer Enzyme näher zu beleuchten, wurden die Proteinkonzentration und die Polygalacturonaseaktivität im Überstand während der Satzkultivierungen aller rekombinanten Stämme untersucht (Abb. 5.3.5). Die Proteinmenge im Überstand zeigte erst nach 48 h einen Unterschied zwischen den vier Stämmen. Bis zu diesem Zeitpunkt befanden sich bei allen Satzkultivierungen rund 400 mg L^{-1} Protein im Kulturüberstand. Nach 48 h begann eine starke Sekretionsphase bei *A. niger* Stamm aKS055, die bis zum Ende der Kultivierung anhielt, so dass am Ende $874 \pm 34 \text{ mg L}^{-1}$ Protein im Überstand gemessen werden konnte. Die *A. niger* Stämme aKS057 und aKS058 zeigten keinen Anstieg in der Proteinkonzentration im Überstand. Im Gegensatz dazu konnte der geringer inokulierte *A. niger* Stamm aKS056 am Ende eine gesteigerte Proteinkonzentration im Überstand von rund 500 mg L^{-1} vorweisen.

Auch bei der Polygalacturonaseaktivität zeigt *A. niger* aKS055 mit Abstand die höchste Aktivität und erreicht mit $141,12 \pm 6,64 \text{ U mL}^{-1}$ mehr als die sechsfache Aktivität im Vergleich zu den drei weiteren Stämmen (Abb. 5.3.5). Dabei zeigte der Stamm eine lineare Zunahme der Aktivität von 40 h bis zum Ende der Kultivierung. Die zweithöchste Polygalacturonaseaktivität von $16,73 \pm 3,67 \text{ U mL}^{-1}$ konnte der *A. niger* Stamm aKS056 trotz der Inokulationsproblematik verzeichnen. Die beiden weiteren Stämme aKS057 und aKS058 zeigten sehr geringe Aktivitäten von rund 9 U mL^{-1} und damit circa 50 % der Aktivität von *A. niger* aKS056 und nur circa 6 % der Aktivität des Spitzenreiters *A. niger* aKS055.

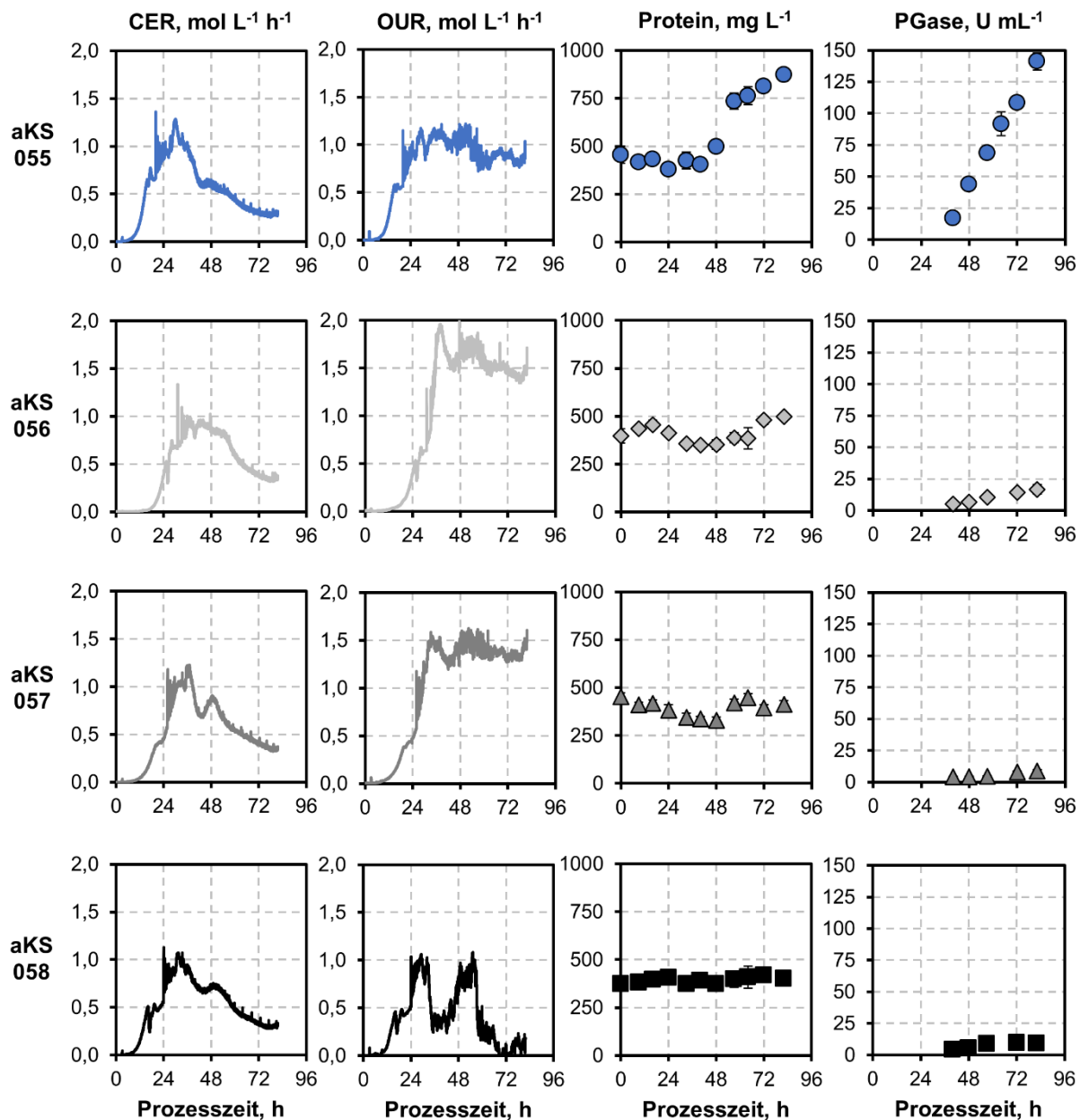


Abb. 5.3.5: Prozessdaten der Satzkultivierungen mit den rekombinanten *A. niger* Stämmen aKS055 bis aKS058. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme rate (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* aKS055 (● —, blau), aKS056 (◇ —, hellgrau), aKS057 (▲ —, dunkelgrau) und aKS058 (■ —, schwarz). (T = 30°C, pH 4,5, P V⁻¹ = 3 W L⁻¹(600 min⁻¹), F_{Luft} = 0,2 bis 2 vvm, V_R = 0,7 L, c_s = 30 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel).

Mit seiner um mehr als die sechsfach erhöhte Polygalacturonaseaktivität und der um 30 % gesteigerten Proteinsekretion im Vergleich zum Wildtyp ATCC 11414 wurde der rekombinante *A. niger* Stamm aKS055 vom Kooperationspartner weiter genetisch verändert, um eine Metabolisierung der D-GalA zu verhindern (*A. niger* aKS090). Zur Charakterisierung dieses neuen Stammes wurde dieser unter identischen Bedingungen wie alle vorherigen Stämme kultiviert und mit dem Vorläuferstamm *A. niger* aKS055 verglichen (Abb. 5.3.6 & Abb. 5.3.7).

Anhand der Zuckerkonzentrationen zeigte sich im direkten Vergleich mit dem Stamm aKS055, dass der *A. niger* Stamm aKS090 keine signifikante Akkumulation von D-Galacturonsäure im Medium ermöglichte (Abb. 5.3.6). Nach einem Konzentrationsmaximum bei 33 h von 0.5 g L^{-1} D-GalA fiel die Konzentration bis zum Ende der Kultivierung wieder nah an die untere Nachweisgrenze ab. Die Konzentration der freien Zucker im Medium verliefen annähernd analog zu den Vorläuferstämmen mit der schnellen Verstoffwechslung von Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Fructose und anschließendem Maximum der Arabinosekonzentration. Nach 48 h lagen, wie auch in den Untersuchungen mit den Vorläuferstämmen beobachtet, keine nennenswerten Konzentrationen an freien Zucker im Nährmedium vor.

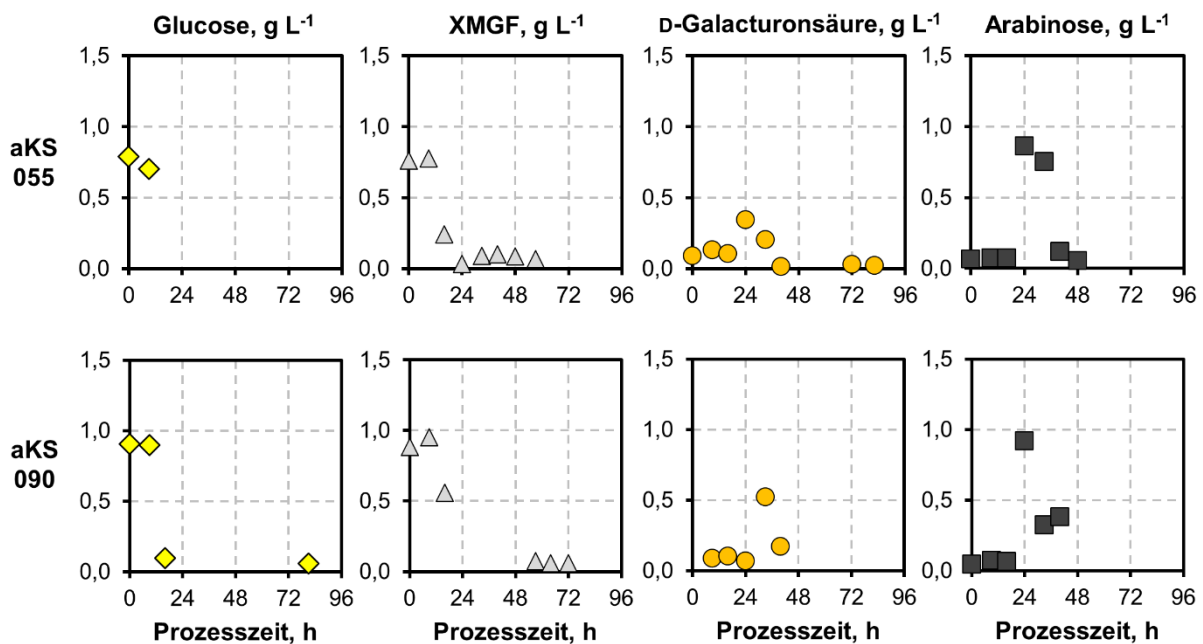


Abb. 5.3.6: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen mit den rekombinanten *A. niger* Stämmen aKS055 und aKS090. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Galacturonsäure (●, orange), D-Glucose (◇, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fructose (△, hellgrau), L-Arabinose (■, dunkelgrau). ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P \text{ V}^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2$ bis 2 vvm , $V_{\text{R}} = 0,7 \text{ L}$, $c_{\text{s}} = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Bis 17 h nach Inokulation war der Verlauf der respiratorischen Daten beider Stämme nahezu identisch. Danach stiegen die Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate von aKS090 deutlich langsamer und erreichten ihr Maximum erst nach 45 h. Die Werte der CER lagen bei aKS090 mit $0,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ knapp unter denen von aKS055 ($1,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Ab der 48 h konnte wie bei dem Vergleichsstamm ein Abfall der CER auf $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen werden. Die Sauerstoffaufnahmeraten stiegen während der Kultivierungen auf einen Maximalwert von bis zu $1.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Für den rekombinanten *A. niger* Stamm aKS090 war ein Anstieg der Proteinkonzentrationen und Polygalacturonaseaktivität nach 40 h Prozesszeit, analog zum Vorläuferstamm aKS055, zu beobachten (Abb. 5.3.7). Mit einer finalen Proteinkonzentration von $839 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ wurde eine vergleichbare Konzentration zum Stamm aKS055 ($874 \pm 34 \text{ mg L}^{-1}$) gemessen. Auch die Polygalacturonaseaktivität von aKS090 zeigte mit $122,36 \pm 4,48 \text{ U mL}^{-1}$ eine zum Vorläuferstamm aKS055 vergleichbare Aktivität ($141,12 \pm 6,64 \text{ U mL}^{-1}$).

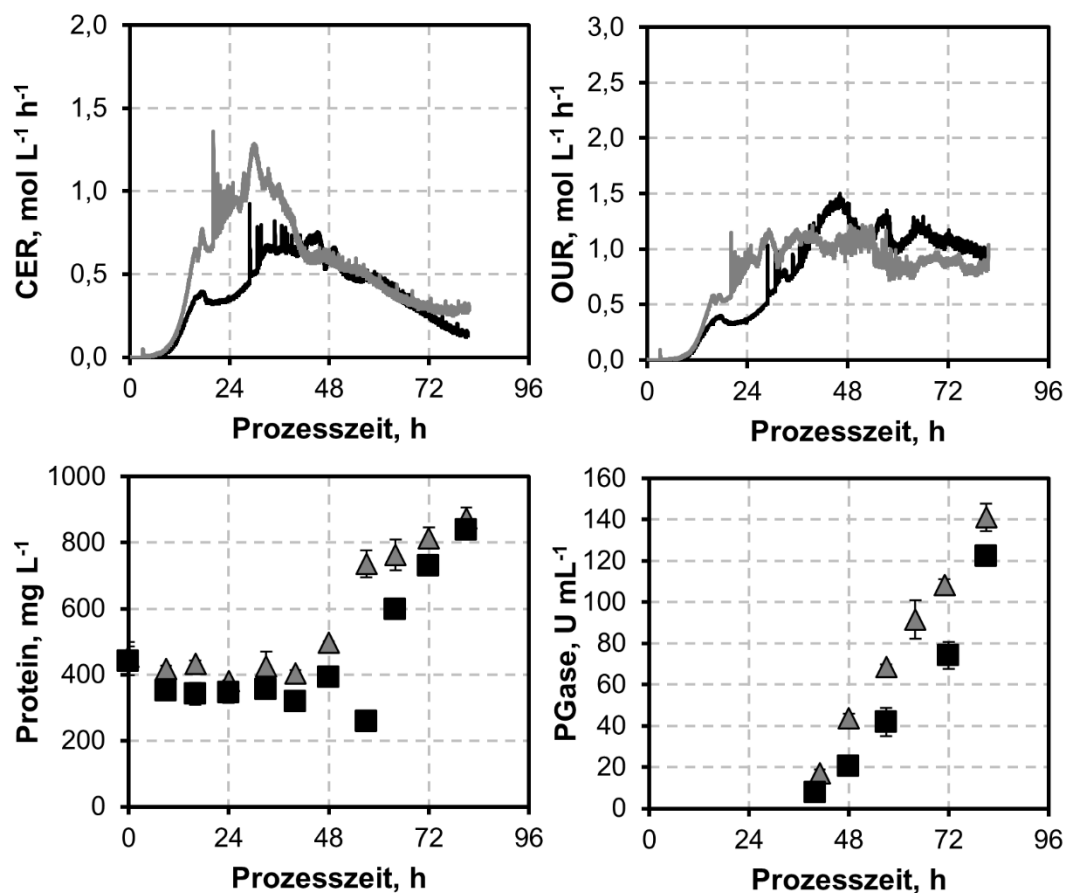


Abb. 5.3.7: Prozessdaten der Satzkultivierungen mit den rekombinanten *A. niger* Stämmen aKS055 und aKS090. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahmerate (OUR), Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen von *A. niger* aKS055 (\triangle —, dunkelgrau) und aKS090 (\blacksquare —, schwarz). ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, 10^9 Sporen L^{-1}).

Die Morphologie des rekombinanten *A. niger* Stämms aKS056 zeigte eine leichte Verkürzung der Hyphen im Vergleich zum Wildtyp und den anderen rekombinanten Stämmen (Abb. 5.3.8). Ansonsten konnten keine deutlichen Unterschiede in der Morphologie zu den zuvor durchgeführten Kultivierungen beobachtet werden (Abb. 5.3.9).

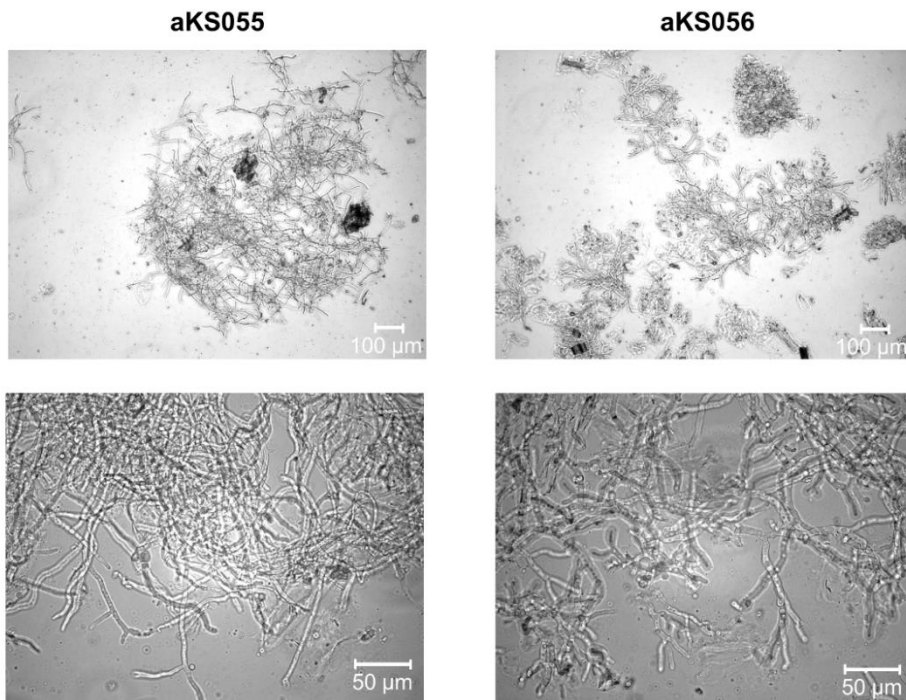


Abb. 5.3.8: Mikroskopische Aufnahmen der rekombinanten *A. niger* Stämme aKS055 und aKS056. Dargestellt sind Aufnahmen der rekombinanten Stämme aKS055 (links) und aKS056 (rechts) bei fünffacher und zwanzigfacher Vergrößerung nach 23 h Kultivierungsdauer. ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P V^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

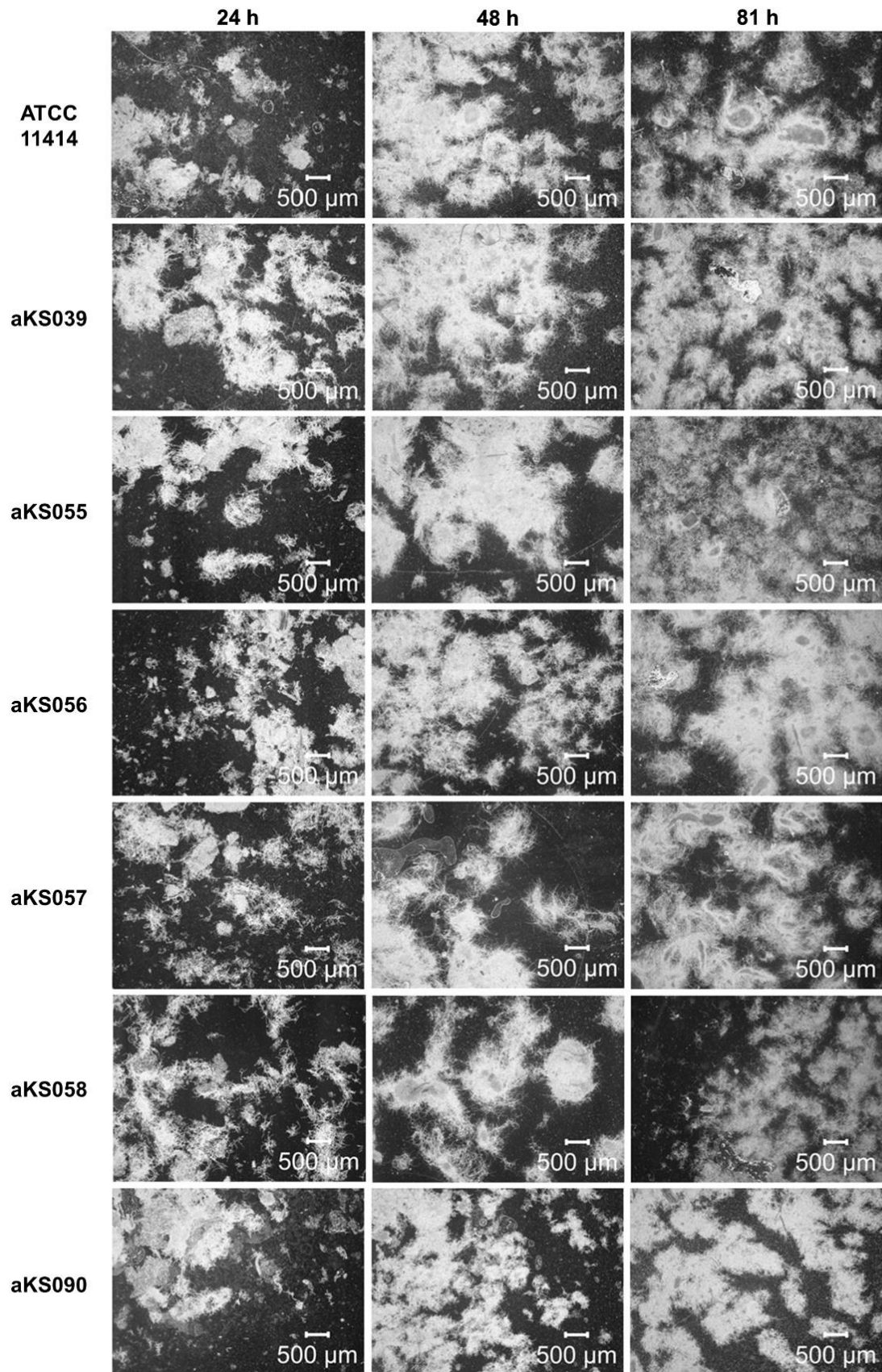


Abb. 5.3.9: Mikroskopische Aufnahmen des Basisstammes ATCC 11414 und der rekombinanten *A. niger* Stämme aKS055 bis aKS090. ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,5$, $P \text{ V}^{-1} = 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,7 \text{ L}$, $c_{\text{s}} = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

Diskussion

Durch die vergleichende Charakterisierung der vier rekombinanten *A. niger* Stämme aKS055, aKS056, aKS057 und aKS058 konnte festgestellt werden, dass die Stämme, sowohl untereinander als auch im Vergleich zu ihrem parentalen *A. niger* Stamm aKS039, Unterschiede in Wachstum, Morphologie, sekretorischer Aktivität (Proteinsekretion) und Polygalacturonaseaktivität aufweisen. Diese Unterschiede sind auf die jeweiligen genetischen Veränderungen der Stämme zurückzuführen.

Zur Verbesserung der sekretierten Polygalacturonaseaktivität wurden vier primäre, aus der Literatur bekannte, Ziele definiert, aus denen die folgenden rekombinante Konstrukte durch den Projektpartner an der TU München (Prof. Dr. J. Philipp Benz, Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft) abgeleitet und generiert wurden. Dabei entstanden die *A. niger* Stämme aKS055 (konstitutive Produktion pektinolytischer Enzyme - Alazi et al. 2018; Niu et al. 2017), aKS056 (Morphologie bedingte Verbesserung der Sekretionsleistung - Fiedler et al. 2018), aKS057 (Aufhebung der Kohlenstoffkatabolitrepression - Mäkelä et al. 2018; Niu et al. 2017) und der Stamm aKS058 (Reduktion endogen sekretierter Proteasen - Conesa et al. 2000; Meyer et al. 2011; Punt et al. 2008).

Mit *A. niger* aKS055 konnte ein Stamm identifiziert werden, der für weitere genetische Veränderungen geeignet war, da dieser Stamm die höchste und damit eine ca. sechsfach höhere Aktivität als der Basisstamm ATCC 11414 ($22,64 \text{ U mL}^{-1}$) und der parentale Stamm aKS039 ($23,06 \text{ U mL}^{-1}$) zeigte. Die Deletion des transkriptionellen Repressors GaaX und die daraus resultierende konstitutive Produktion pektinolytischer Enzyme erwies sich damit als erfolgreichster Ansatz.

Interessant war auch der rekombinante *A. niger* Stamm aKS056. Die Deletion des *racA* Gens, durch welche es zu einer erhöhten Hyphenverzweigung und damit einer Erhöhung der sekretionsaktiven Oberfläche kommt, zeigte auch einen positiven Effekt auf die Sekretion hydrolytischer Enzyme. Obwohl dieser Stamm mit nur 12,6 % der Sporenmenge angeimpft wurde, zeigte er bessere Ergebnisse als die beiden anderen rekombinanten Stämme aKS057 und aKS058. Wie im Vorversuch in Kapitel 5.2.4 und in der Literatur gezeigt werden konnte, hat eine verringerte Inokulationsmenge meist ein negatives Ergebnis auf die Aktivität des gewünschten Enzyms (Kiep 2011; Wucherpfennig et al. 2010). Allerdings müsste zur Verwendung dieses Stammes für die Produktion pektinolytischer Enzyme die niedrige Sporulationsdichte während der Anzucht der Vorkultur behoben werden, um so die optimale Inokulationsdichte von 10^9 Sporen L^{-1} zu Beginn des Prozesses einsetzen zu können. Genetische Veränderungen in Bezug auf die Kohlenstoffkatabolitrepression (CCR) und Reduktion sekretierter Proteasen zeigten einen negativen Effekt auf die Produktion pektinolytischer Enzyme.

Erstaunlicher Weise konnte der *A. niger* Stamm aKS090, trotz der Deletion zweier D-GalA Reduktasen, die aus den Zuckerrübenschnitzeln freigesetzte D-GalA nahezu vollständig verstoffwechseln. Dies liegt höchstwahrscheinlich an der hohen Komplexität und Redundanz des Zuckertransports und des Zuckermetabolismus in *A. niger*, so dass davon auszugehen ist, dass mehr als die beiden deletierten Reduktasen in den Metabolismus von D-GalA involviert sind. Aufgrund der vergleichbaren produzierten Polygalacturonaseaktivität der beiden rekombinanten Stämme aKS055 und aKS090, kann davon ausgegangen werden, dass die genetischen Veränderungen des Stammes aKS090 keinen Einfluss auf sein Sekretionsverhalten pektinolytischer Enzyme hatte.

5.4 Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln

Das primäre Ziel der Hydrolyse ist die möglichst vollständige Freisetzung der D-Galacturonsäure, um eine ökonomisch erfolgreiche Weiterverarbeitung der Zuckersäure zu ermöglichen. Als Voraussetzung zur Bestimmung der Hydrolyseeffizienz und Hydrolyseausbeute wurde als Erstes eine Analyse der Zusammensetzung der verwendeten Charge des Substrats Zuckerrübenschnitzel durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung des hergestellten Enzymgemischs wurde dessen Inhibierung durch die bei der Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere untersucht. Nach Abschluss der beiden wichtigen Voruntersuchungen wurde zunächst der Einfluss der Variablen: Puffersubstanz, Hydrolysedauer und Temperatur im mL-Maßstab näher betrachtet. Anschließend wurden Untersuchungen zu den Variablen pH, Substratkonzentration und Enzymkonzentration im Rührkesselreaktor zur Verbesserung der Hydrolyse durchgeführt.

5.4.1 Zusammensetzungsanalyse der Zuckerrübenschnitzel

Bei einem komplexen Substrat wie Zuckerrübenschnitzeln ist die genaue Bestimmung der Zusammensetzung aufgrund der Heterogenität und Komplexität durchaus anspruchsvoll. Dabei spielen vor allem die unterschiedlichen Stabilitäten der enthaltenen Zuckerpolymere eine zentrale Rolle. Hauptsächlich bestehen Zuckerrübenschnitzel aus Cellulose, Hemicellulose und Pektin. Da diese drei Polymere chemisch und physikalisch sehr unterschiedliche Eigenschaften und Stabilitäten besitzen, musste zunächst ein Verfahren erarbeitet werden, das einen hohen Hydrolysegrad bei niedrigem Zerstörungsgrad der freigesetzten Zucker gewährleistet.

Zur Bestimmung der Zuckerzusammensetzung der Zuckerrübenschnitzel wurde das in Kapitel 4.5.7 beschriebene zweistufige Verfahren, bestehend aus einer sauren Hydrolyse mit 2 mol L^{-1} Trifluoressigsäure gefolgt von einer enzymatischen Hydrolyse mit kommerziellen Enzympräparaten, siehe Tabelle 9.1.5, angewandt. Im Vorfeld wurden verschiedene Bedingungen der Totalhydrolyse untersucht und die Methode mit dem geringsten Verlust an Monomeren Zuckern zur Analyse der Zuckerrübenschnitzel ausgewählt. Alle Bestandteile, die nicht der Zuckerfraktion zugehörig waren, wurden als Trockenmasse zusammengefasst. Die nach Anwendung der Hydrolyse entstandenen Überstände wurden auf ihre Konzentration der in Zuckerrübenschnitzeln vorkommenden Zucker D-Xylose, D-Mannose, L-Fucose, L-Arabinose, D-Glucose, L-Rhamnose, D-GalA, D-Galactose, sowie D-Glucuronsäure untersucht. Zur Kontrolle wurden neben der Zuckerrübenschnitzelbiomasse auch reine Cellulose (Avicel) und ein Zuckerstandard mit allen in der Zuckerrübenbiomasse enthaltenen Zuckermonomeren der Hydrolyse unterzogen. Zur Errechnung eines Verlustausgleichsfaktors wurde der Verlust an Zuckermonomeren in dem Zuckerstandard während der Hydrolysebehandlung über die Ausbeute bestimmt (Abb. 5.4.1).

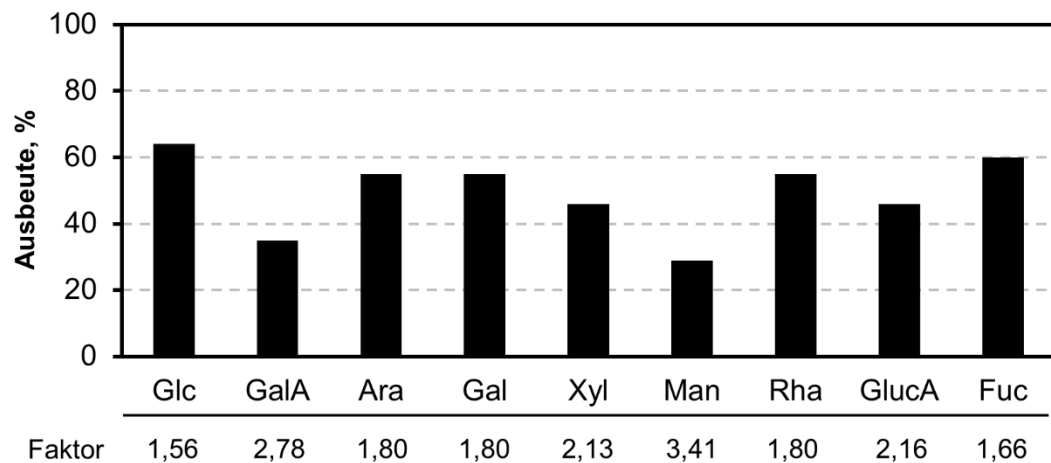


Abb. 5.4.1: Ausbeute und Verlustausgleichsfaktoren der Zuckermonomerstandards bei der Zusammensetzungsanalyse. Dargestellt ist die Ausbeute der einzelnen Zuckermonomere nach Behandlung eines Zuckerstandards unter Bedingungen der Zusammensetzungsanalyse (siehe Kapitel 4.5.7). Zusätzlich ist der Verlustausgleichsfaktor der einzelnen Zuckermonomere angegeben. (D-Glucose (Glc), D-Galacturonsäure (GalA), L-Arabinose (Ara), D-Galactose (Gal), D-Xylose (Xyl), D-Mannose (Man), L-Rhamnose (Rha), D-Glucuronsäure (GlucA) und L-Fucose (Fuc)).

Nach Analyse der Zuckermonomere mittels hochsensitiver HPAEC-PAD (Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion), die in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner an der TU München (Prof. Dr. J. Philipp Benz, Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft) durchgeführt wurde, konnte die in Tabelle 5.4.1 dargestellte Zusammensetzung der Zuckerrübenschnitzel erhalten werden. Zusätzlich sind publizierte Daten und deren Mittelwert angegeben, um die experimentellen Daten dieser Charge Zuckerrübenschnitzel einordnen zu können.

Tabelle 5.4.1: Zusammensetzung Zuckerrübenschnitzel (%Trockenmasse).

Glu	GalA	Ara	Gal	Xyl	Man	Rha	Fuc	GluA	RM*	Referenz
13,6	21,8	21,6	6,9	1,2	0,5	6,8	0,2	0,3	28,5	Ergebnis
24,5	22,0	17,9	4,5	1,1	1	2	0	0	27,0	(Kühnel 2011)
23,3	19,8	23,5	5,8	1,7	1,3	2,1	0,2	0	21,4	(Micard et al. 1994)
21,1	21,1	20,9	5,1	1,7	1,1	2,4	0,2	0	21,4	(Micard et al. 1996)
21,7	18,9	17,3	4,3	1,5	1,5	1,1	0	0	25,4	(Rouau et al. 1987)
22,7	20,4	19,9	4,9	1,5	1,2	1,9	0,1	0	23,8	Mittelwert Literatur

* RM = Restmas; (D-Glucose (Glc), D-Galacturonsäure (GalA), L-Arabinose (Ara), D-Galactose (Gal), D-Xylose (Xyl), D-Mannose (Man), L-Rhamnose (Rha), D-Glucuronsäure (GlucA) und L-Fucose (Fuc))

Diskussion

Durch die Zusammensetzungsanalyse der in dieser Arbeit verwendeten Charge an Zuckerrübenschnitzeln konnten für die Zucker D-Xylose, L-Fucose, L-Arabinose, D-Galacturonsäure und D-Fructose mit der Literatur vergleichbare Werte bestimmt werden. Geringfügige Abweichungen wurden für die Zucker D-Galactose (~2 % höher als dargestellte Literaturdaten) und D-Mannose (niedriger als dargestellte Literaturdaten) bestimmt. Der Anteil der Zuckersäure D-Glucuronsäure wurde in der Literatur nicht genannt. Auffällig bei der Analyse waren die deutlichen Unterschiede im prozentualen Rhamnose- und Glucoseanteil der untersuchten Zuckerrübenschnitzel im Vergleich zur Literatur.

Nach Auswertung der Cellulosekontrolle konnte eine unvollständige Hydrolyse der Cellulose festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt auf eine nicht ausreichende Säurehydrolyse und/oder enzymatische Hydrolyse schließen. Dies ist wahrscheinlich Grund für einen niedrigeren Glucoseanteil als in der Literatur beschrieben. Die Unterschiede zur Literatur können zum einen auf die Substrateigenschaften und zum anderen auf das verwendete Hydrolyseprotokoll zurückgeführt werden. Zuckerrübenschnitzel sind ein sehr heterogenes Substrat, dessen Zusammensetzung stark von den Anbaubedingungen abhängig ist und damit eine hohe Varianz in der Zusammensetzung aufweisen kann (Kracher et al. 2014). Der zweite Einflussfaktor sind die unterschiedlichen Stabilitäten der Zuckerpolymeren Cellulose, Hemicellulose und Pektin (Pandey et al. 2015). Das zur totalen Hydrolyse verwendete Protokoll sollte eine Balance zwischen Hydrolysegrad und Ausbeuteverlust durch Zersetzung der labilen Bestandteile der Biomasse ermöglichen. Hierzu zählen vor allem einzelne Komponenten der Hemicellulose und des Pektins wie beispielsweise D-Galacturonsäure und Arabinose (Berlowska et al. 2018a). Durch zu extreme Bedingungen kommt es zum Ausbeuteverlust und damit zu einer Unterbestimmung dieser Komponenten. Die Labilität der einzelnen Zucker während der verwendeten Hydrolysemethode konnte durch die Bestimmung der Ausbeute und Verlustausgleichsfaktoren (Abb. 5.4.1) bestätigt werden. Auch in der Literatur werden vergleichbare Ausbeuteverluste während der sauer-thermischen Hydrolyse mit anschließender enzymatischer Behandlung von Zuckerrübenschnitzeln beschrieben (Kühnel et al. 2011).

Bei der Zusammensetzungsanalyse der Zuckerrübenschnitzel konnte die Massenbilanz annähernd vollständig geschlossen werden. Die bestimmte Zusammensetzung wurde daher in Verbindung mit dem Glucoseanteil aus der Literatur als Basis zur Bestimmung der Ausbeute aller Nachfolgenden Untersuchungen zur Hydrolyse der Zuckerrübenschnitzel verwendet.

5.4.2 Untersuchung zur Inhibierung der hergestellten Enzymmischung

Aufgrund der Komplexität des Biopolymers Pektin und des bei der Hydrolyse entstehenden Stoffgemisches war ein Effekt auf die enzymatische Aktivität der hergestellten Enzymmischung nicht auszuschließen. In der Literatur wird ein inhibitorischer Effekt freigesetzter D-Galacturonsäurekonzentrationen zwischen 4-12 g L⁻¹ auf die Aktivität pektinolytischer Enzyme beschrieben (Baciu & Jördening 2004; Bélafi-Bakó et al. 2007). Aus diesem Grund wurde eine viskositätsbasierte Untersuchungsmethode etabliert, mit der eine mögliche Inhibierung der hergestellten Enzyme durch die bei der Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere untersucht werden konnte. Grundlage der entwickelten Methodik ist die Viskositätsabnahme einer Zitruspektinlösung während der Inkubation mit hydrolytischen Enzymen. Anhand des Vergleichs der Viskositätsabnahmen bei Zugabe von Zuckermonomeren zum Reaktionsansatz kann somit eine eventuelle Inhibierung der Hydrolyse untersucht werden.

Zur Untersuchung einer möglichen Inhibierung durch die bei der Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere, wurde die Viskositätsabnahme einer Zitruspektinlösung nach Zugabe einer Enzymmischung (Referenz) und nach jeweiliger Zugabe zweier Enzym-Zuckermischungen untersucht. Als Zuckermischung wurde in beiden Versuchen die Zuckermonomere aus Tabelle 5.4.2 eingesetzt. Zusätzlich wurde in einem der beiden Versuche 20 g L⁻¹ D-Galacturonsäure hinzugegeben. Als Kontrolle wurde anstelle der Enzym-Zuckermischung eine Pufferlösung eingesetzt (Abb. 5.4.2). Während der Analyse wurde in allen Untersuchungen die gleiche, aus einer Kultivierung mittels *A. niger* ATCC11414 stammende Enzymmischung verwendet.

Tabelle 5.4.2: Eingesetzte Zuckerkonzentrationen während der Untersuchung der Enzym-Inhibition.

Eingesetzte Zuckerkonzentrationen, g L ⁻¹					
Glucose	Arabinose	Galactose	Xylose	Mannose	Rhamnose
20	20	7	1	1	7

Der Verlauf der Viskosität in den Kontrollversuchen ohne Enzymzugabe zeigte nach drei Minuten eine konstante Viskosität von 30 Pa s bis zum Ende der Messung. Im Referenzversuch, bei dem die Enzymmischung hinzugefügt wurde, konnte innerhalb der untersuchten 20 Minuten eine Viskositätsabnahme um 50 % von 30 Pa s auf 15 Pa s beobachtet werden. Dieser Verlauf wurde als Standard definiert und sollte mit den Versuchen mit Zugabe von Zuckermonomeren verglichen werden.

Ein Versuch wurde mit Zugabe des in Tabelle 5.4.2 dargestellten Zuckergemischs sowie 20 g L^{-1} D-Galacturonsäure durchgeführt. Diese Mischung sollte das Produktspektrum vollständig hydrolysierter Zuckerrübenschnitzel widerspiegeln. Ein weiterer Versuch wurden analog zum ersten Versuch ohne Zugabe von D-Galacturonsäure durchgeführt, um die Rolle der freiwerdenden D-Galacturonsäure bei einer möglichen Inhibition der Enzyme näher beleuchten zu können. Bei beiden Versuchen konnte eine zur Referenz vergleichbare Abnahme der Viskosität beobachtet werden (Abb. 5.4.2).

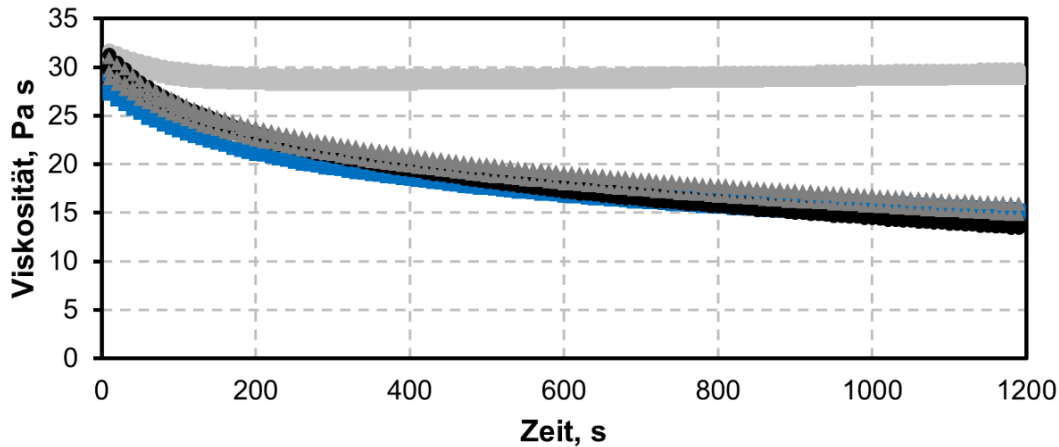


Abb. 5.4.2: Viskositätsverläufe während der Hydrolyse von Zitruspektin mit der von *A. niger* hergestellten Enzymmischung. Dargestellt ist der Viskositätsverlauf einer 20 g L^{-1} Zitruspektinlösung bei pH 4.5, 30 °C im Rheometer (Rheolab QC, Anton Paar, Graz, Österreich; konstante Scherrate von 2000 s^{-1}) mit Zugabe von: Kontrolle mit Puffer (hellgrau), Referenz mit Enzymmischung (blau), Versuch 1 mit 20 g L^{-1} D-Galacturonsäure und Zuckern aus Tabelle 5.4.2 (schwarz), Versuch 2 mit Zuckern aus Tabelle 5.4.2 (dunkelgrau).

Diskussion

In Verbindung mit den Ergebnissen aus dem Kontrollversuch konnte die Grundlage der Messmethodik (Rheologische Messung der Viskositätsabnahme einer Zitruspektinlösung durch enzymatische Hydrolyse) bestätigt werden. Die mitgeführte Kontrolle ohne Enzymzugabe zeigte, dass es sich bei den Ergebnissen nicht um eine temperatur- oder scherbedingte Abnahme der Viskosität handelte, sondern um eine auf der hydrolytischen Aktivität der Enzymmischung basierende Viskositätsabnahme.

Aus den ähnlichen Viskositätsabnahmeverläufen der Referenz und der beiden induzierten Inhibitionsuntersuchungen konnte abgeleitet werden, dass unter den untersuchten Bedingungen (kurze Reaktionszeiten, frische Enzymmischung) keine Reduktion der initialen Reaktionsgeschwindigkeit und damit keine Inhibition der hergestellte Enzymmischung weder durch die freien Zuckermonomere noch D-Galacturonsäure ausgeübt wurde. Damit konnte eine Inhibition der pektinolytischen Aktivität durch D-Galacturonsäure, wie sie in der Literatur mit einer Inhibitionskonstanten $K_i = 3.13 \text{ g L}^{-1}$ postuliert wird, in der durchgeführten Untersuchung nicht bestätigt werden (Bélafi-Bakó et al. 2007).

5.4.3 Enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im mL-Maßstab

Das zur Hydrolyse eingesetzte Enzymgemisch wurde mit *A. niger* hergestellt (siehe Kapitel 4.3). Die Enzymkonzentrationen waren aufgrund der maximal produzierten Polygalacturonaseaktivität des Wildtypstammes *A. niger* ATCC 11414 und der eingesetzten Substratkonzentration auf maximal $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ limitiert.

Puffer

Häufig wird bei der enzymatischen Hydrolyse ein Natriumacetat-Puffer verwendet, da dieser im gewünschten pH-Bereich von pH 3,7-5,6 gute Pufferkapazität bietet. Als Alternative wurde Kaliumcitrat untersucht. Hierzu wurden Hydrolysen, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, im Triplikat durchgeführt. Untersucht wurden 50 mM Natriumacetat, 50 mM Kaliumcitrat und 150 mM Kaliumcitrat. Hydrolysiert wurde eine Substratmenge von 50 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel mit $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ bei 30 °C und initialem pH 4,5.

Die während der Hydrolyse freigesetzten Zucker und Zuckersäuren haben einen starken Einfluss auf den pH des Mediums, weswegen dieser im Verlauf der Hydrolyse systematisch erfasst wurde (Abb. 5.4.3). Bei initialem pH 4,15 konnte in den Satzprozessen mit 50 mM Puffer eine vergleichbare Abnahme auf pH 4,0 beobachtet werden. Während der Hydrolyse mit 150 mM Kaliumcitrat konnte eine Abnahme auf pH 4,2 gemessen werden.

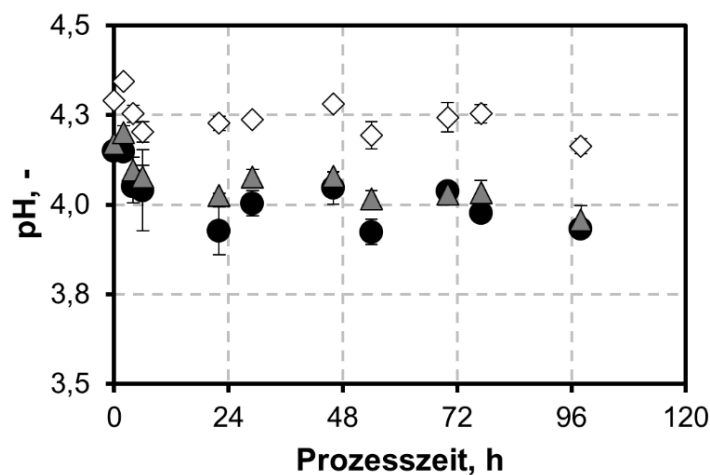


Abb. 5.4.3: pH Verlauf während der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln in Abhängigkeit des eingesetzten Puffers. 50 mM Natriumacetat (●, schwarz), 50 mM Kaliumcitrat (▲, grau) und 150 mM Kaliumcitrat (◇, weiß). ($T = 30 \text{ °C}$, $n = 500 \text{ min}^{-1}$ (S-Rührer & unbewehrte Reaktoren), $V_R = 12 \text{ mL}$, $c_S = 50 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$).

Im Hydrolyseüberstand konnten die in Abb. 5.4.4 dargestellten Zuckermonomere gemessen werden. Dabei konnte innerhalb der ersten 6 h eine schnelle Freisetzung der untersuchten Zuckermonomere beobachtet werden. Anschließend verlangsamte sich die Zuckerfreisetzung bis zum Ende der Hydrolyse. Vor allem die Freisetzung von Arabinose und des Gemischs von Xylose, Galactose, Mannose und Fructose zeigte eine stärkere Verlangsamung der Freisetzungsgeschwindigkeit, so dass ab 48 h Prozesszeit nur eine geringe Konzentrationssteigerung dieser Zucker zu beobachten war. Trotz unterschiedlicher Puffer und Puffermolaritäten konnten zum Ende der Hydrolyse (96 h) in allen Prozessen vergleichbare Zuckerkonzentrationen erreicht werden: $5,45 \pm 0,32 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, $10,52 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $4,25 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ Xylose, Mannose, Galactose und Fructose sowie $11,14 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose.

Für das gewünschte Produkt D-Galacturonsäure konnten während der Hydrolyse Raum-Zeit-Ausbeuten von $0,052\text{-}0,056 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Bezogen auf die Zusammensetzung der Zuckerrübenschnitzel (siehe Kapitel 5.4.1) konnte somit eine Ausbeute von $50 \pm 3 \%$ D-Galacturonsäure, $93 \pm 2 \%$ Glucose, $99 \pm 3 \%$ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und $100 \pm 2 \%$ Arabinose erreicht werden (Abb. 5.4.3). Insgesamt konnten rund 31 g L^{-1} Zuckermonomer freigesetzt werden, was einer Gesamtzuckerausbeute von $\sim 77 \%$ entspricht. Aufgrund der Ergebnisse wurde 50 mM Kaliumcitrat als Puffer (pH 4,5) für alle weiteren Hydrolysen im mL-Maßstab verwendet.

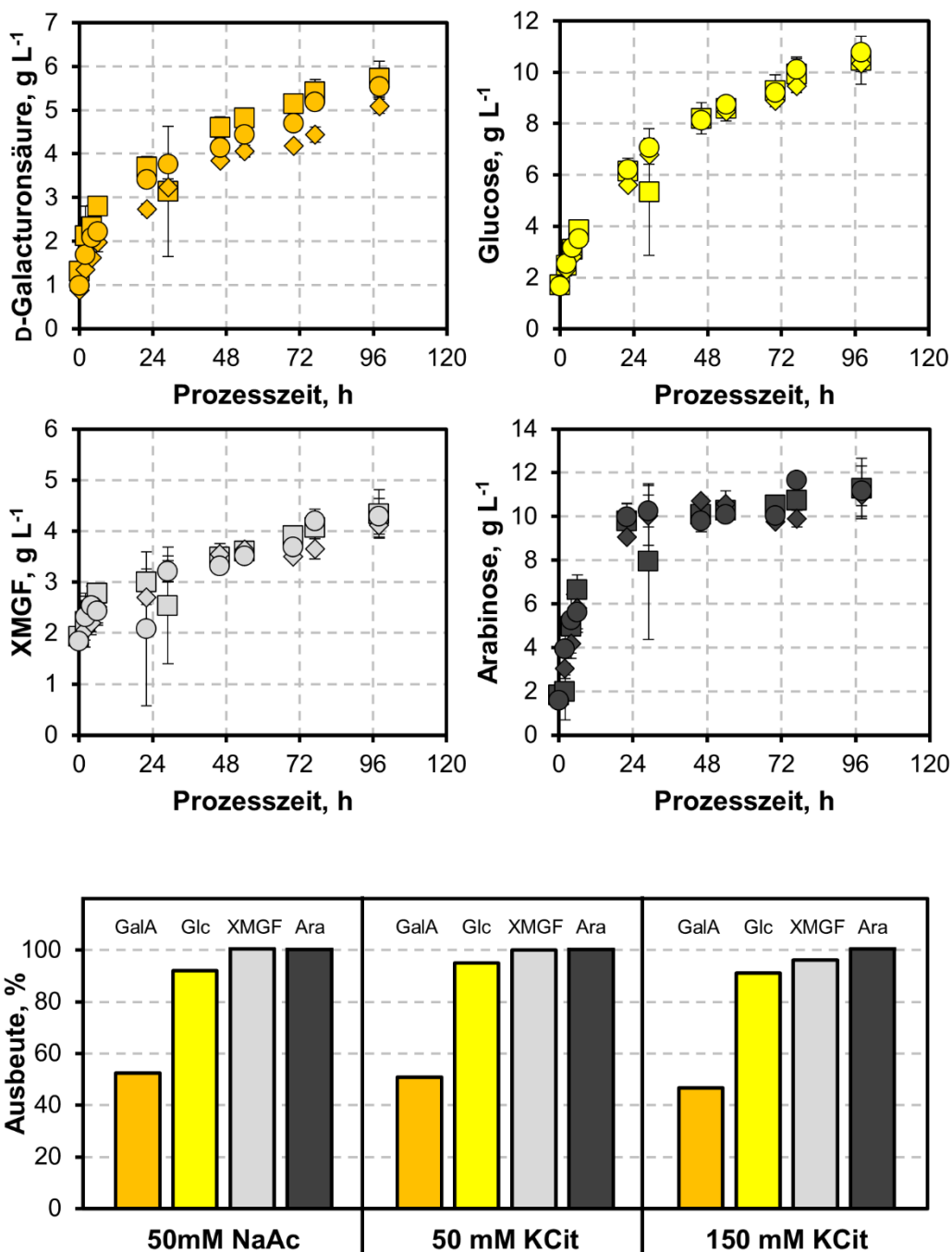


Abb. 5.4.4: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln in Abhängigkeit des Puffers. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration und die finale Ausbeute von D-Galacturonsäure (GalA, orange), Glucose (Glc, gelb), Xylose-Mannose-Galactose-Fruktose (XMGF, hellgrau) und Arabinose (Ara, dunkelgrau) in 50 mM Natriumacetat (□, Viereck), 50 mM Kaliumcitrat (○, Kreis) und 150 mM Kaliumcitrat (◇, Raute). (T = 30°C, n = 500 min⁻¹ (S-Rührer & unbewehrte Reaktoren), V_R = 12 mL, c_s = 50 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel, 100 U g⁻¹Substrat).

Hydrolysedauer

Es wurde eine Langzeithydrolyse von 507 h durchgeführt. Dabei konnte ein pH Abfall innerhalb der ersten 77 h von einem initialem pH 4,5 auf pH 3,9 beobachtet werden. Dieser pH veränderte sich bis zum Ende der Hydrolyse nicht. Die Zuckerkonzentrationen sind in Abb. 5.4.5 dargestellt. Über den Verlauf der Hydrolyse war eine Freisetzung der Glucose bis zu 435 h (10,91 g L⁻¹) zu beobachten. Die Freisetzung von D-Galacturonsäure und der Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose und Fructose erfolgte bis 293 h. Ab diesem Zeitpunkt lagen die maximalen und damit auch finalen Konzentrationen der Zucker vor (7,48 g L⁻¹ D-Galacturonsäure und 5,25 g L⁻¹ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose). Die Freisetzung von Arabinose zeigte nach schnellem Konzentrationsanstieg ab 77 h eine starke Verlangsamung der Freisetzungsgeschwindigkeit. Am Ende konnten 10,47 g L⁻¹ freigesetzt werden.

Insgesamt konnte eine Ausbeute von 69 % D-Galacturonsäure, 96 % Glucose, 100% Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und 100 % Arabinose erreicht werden. Somit konnten ~ 34 g L⁻¹ Zuckermonomer freigesetzt werden (Gesamtzuckerausbeute von ~ 83 %).

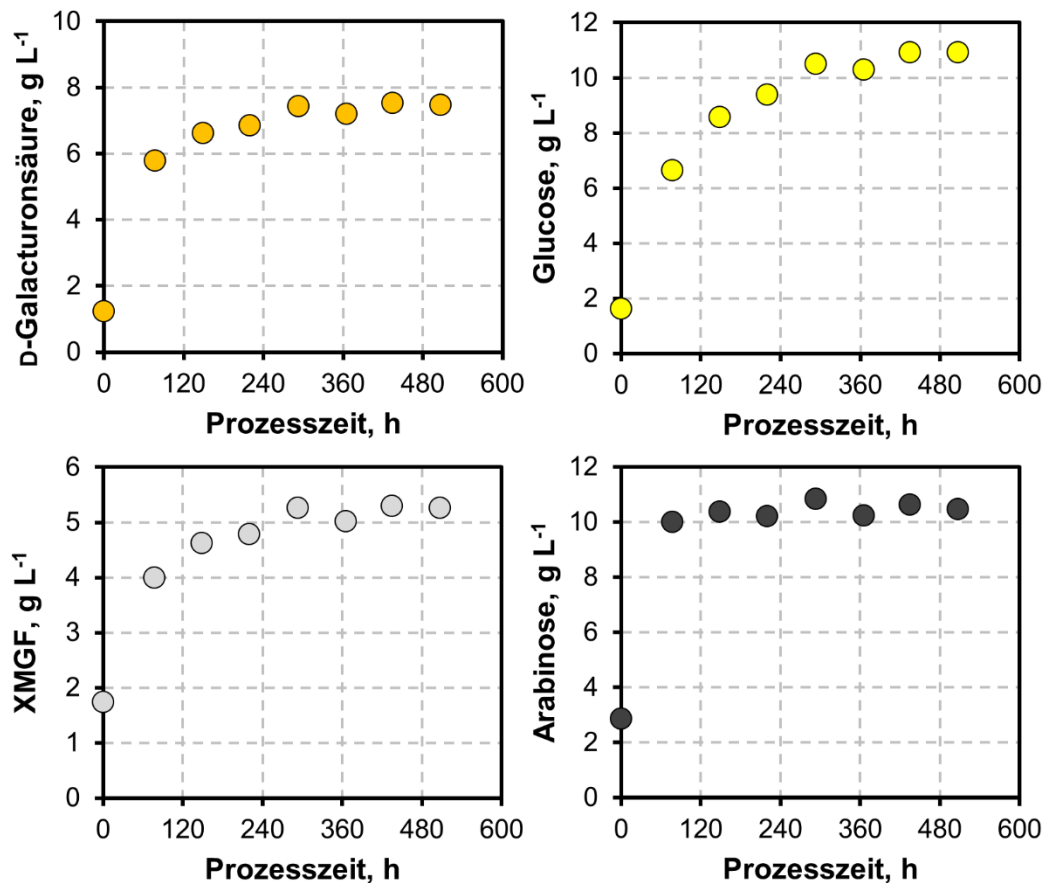


Abb. 5.4.5: Zuckerkonzentration während der enzymatischen Langzeithydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration von D-Galacturonsäure (●, orange), Glucose (●, gelb), Xylose-Mannose-Galactose-Fructose (○, hellgrau) und Arabinose (●, dunkelgrau) während der Hydrolyse für 507 Stunden. ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 200 \text{ min}^{-1}$ (Schottflasche im Schüttelinkubator), $V_R = 50 \text{ mL}$, $c_s = 50 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$).

Temperatur

Zunächst wurde die optimale Reaktionstemperatur der mittels *A. niger* hergestellten Enzymmischung untersucht. Diese wurde für die Polygalacturonase- und Cellulaseaktivität bei Temperaturen zwischen 10 °C bis 100 °C ermittelt. Anschließend wurden die Aktivitäten auf die höchste bestimmte Aktivität normiert (Abb. 5.4.6). Deutlich zu erkennen sind unterschiedliche Temperaturoptima der Polygalacturonase- und Cellulaseaktivität. Bei der Polygalacturonaseaktivität konnte eine Aktivitätssteigerung bis 50 °C mit einem rapiden Abfall der Aktivität bei höheren Temperaturen beobachtet werden. Die Cellulaseaktivität dagegen zeigte ihr Optimum erst bei 70 °C und einen langsameren Abfall bei höheren Temperaturen. Bei der optimalen Temperatur der Polygalacturonaseaktivität von 50 °C werden 60 % der maximalen Cellulaseaktivität erreicht. Das entspricht einer Steigerung um bis zu 33 % Polygalacturonase- und 20 % Cellulaseaktivität im Vergleich zur Aktivität bei der zuvor verwendeten Kultivierungstemperatur von 30 °C.

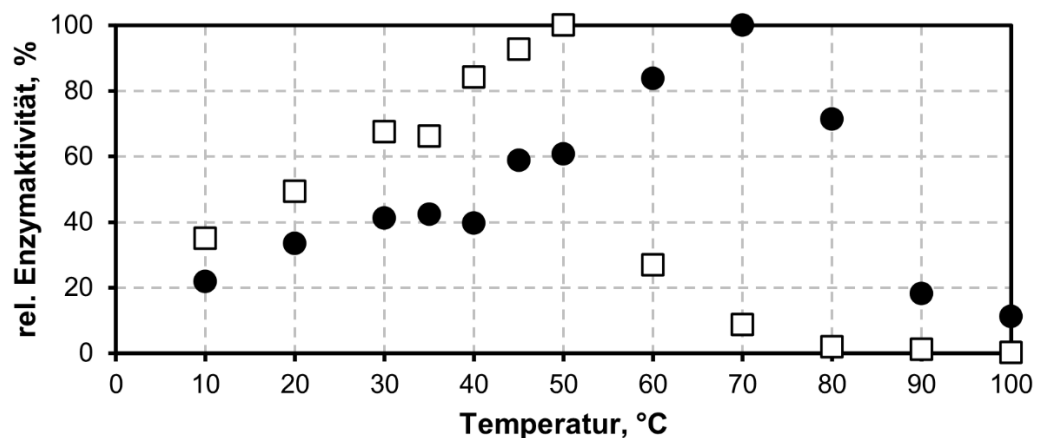


Abb. 5.4.6: Einfluss der Temperatur auf die relative Polygalacturonase- und Cellulaseaktivität der mittels *A. niger* hergestellten Enzymmischung. Dargestellt ist die Cellulaseaktivität (●) und Polygalacturonaseaktivität (□) in Abhängigkeit der Temperatur. Als Substrat für Polygalacturonase wurde Polygalacturonsäure und für Cellulase Carboxymethylcellulose verwendet.

Aufbauend auf der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Polygalacturonase und Cellulase wurden Hydrolysen von 50 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Enzymkonzentration von $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ im mL-Maßstab durchgeführt. In den Prozessen wurde mit 50 mM Kaliumcitrat als Puffer gearbeitet. Zu Beginn der Prozesse lag initial pH $4,5$ vor, welcher in den Hydrolysen bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ auf pH $4,0$ und bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ final auf pH $3,8$ absank, wobei ein qualitativ vergleichbarer Verlauf bei beiden Temperaturen beobachtet werden konnte.

Der zeitliche Verlauf der Zuckerkonzentrationen während der Hydrolysen sind in Abb. 5.4.7 dargestellt. Dabei konnte bei allen Zuckern außer Arabinose ein kontinuierlicher Anstieg der Zuckerkonzentrationen bis zum Ende der Hydrolysen beobachtet werden. Generell konnten höhere Freisetzungsgeschwindigkeiten bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zu $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen werden. Eine deutliche Steigerung konnte bei der Freisetzung der höchstwahrscheinlich aus Cellulose stammenden Glucose beobachtet werden, so dass die Konzentrationen schon nach 20 h die maximalen Konzentrationen der nach 96 h bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erhaltenen Glucosekonzentration überstieg. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für D-GalA und Xylose, Mannose, Galactose, Fructose beobachtet werden. Dabei wurde die maximal erreichte Konzentration der Hydrolyse bei 30°C in der Hydrolyse bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ schon nach 48 h überschritten. Die Freisetzung der Arabinose zeigte zu Beginn der Hydrolyse eine starke Beeinflussung der Temperatur. Nach 24 h kam es nur noch zu einer geringen Konzentrationssteigerung bis zum Ende der Hydrolyse.

Final wurden bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $5,74 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, $6,49 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $3,76 \pm 0,30 \text{ g L}^{-1}$ Xylose, Mannose, Galactose und Fructose und $10,12 \pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose freigesetzt. Während der Hydrolyse bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten Raum-Zeit-Ausbeuten für D-Galacturonsäure von $0,060 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ Hydrolysetemperatur wurden bis zum Ende $7,00 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, $10,34 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $4,60 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ Xylose, Mannose, Galactose und Fructose und $10,22 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose freigesetzt. Für das gewünschte Produkt D-Galacturonsäure konnte so während der Hydrolyse bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Raum-Zeit-Ausbeuten von $0,073 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden.

Bei der Hydrolyse bei 30°C konnten Ausbeuten von 53% D-Galacturonsäure, 57% Glucose, 88% Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und 94% Arabinose erreicht werden (Abb. 5.4.7). Insgesamt wurden in 96 h 26 g L^{-1} Zuckermonomer freigesetzt, was einer Gesamtzuckerausbeute von $\sim 60 \%$ entspricht. Im Vergleich dazu konnten bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 64% D-Galacturonsäure, 91% Glucose, 100% Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und 94% Arabinose freigesetzt werden (Abb. 5.4.7). Somit konnten bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nach 96 h mit $100 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ 32 g L^{-1} Zuckermonomer freigesetzt werden, was einer Gesamtzuckerausbeute von $\sim 78 \%$ entspricht.

Durch die Temperaturerhöhung konnte die Ausbeute der Hydrolyse um 11 % D-Galacturonsäure, 33 % Glucose, 12 % Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und 1 % Arabinose gesteigert werden.

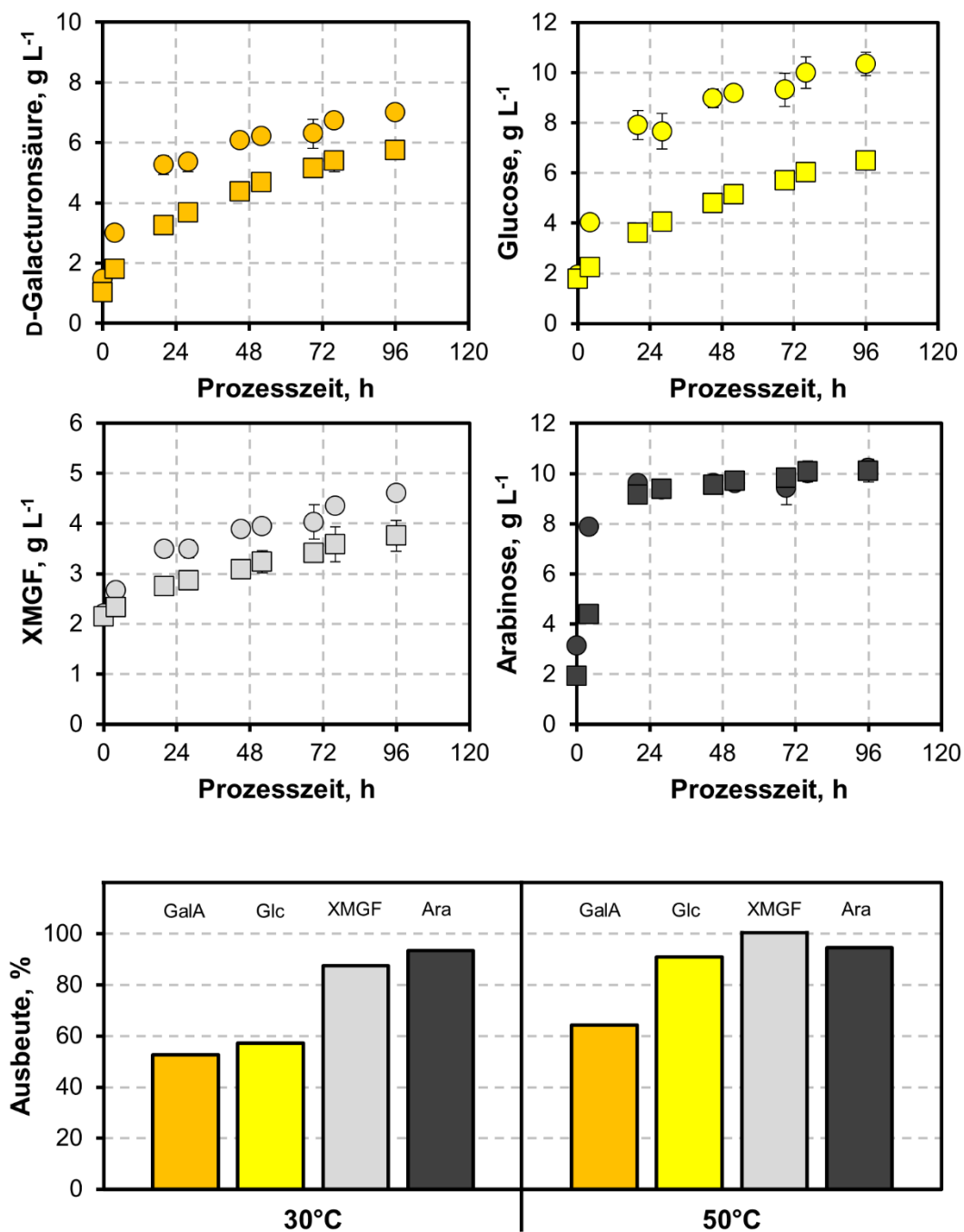


Abb. 5.4.7: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln bei 30 °C und 50 °C. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration und die finale Ausbeute von D-Galacturonsäure (GalA, orange), Glucose (Glc, gelb), Xylose-Mannose-Galactose-Fructose (XMGF, hellgrau) und Arabinose (Ara, dunkelgrau) bei 30 °C (□, Viereck) und 50 °C (○, Kreis). ($n = 500 \text{ min}^{-1}$ (S-Rührer & unbewehrte Reaktoren), $V_R = 12 \text{ mL}$, $c_s = 50 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $100 \text{ U g}^{-1}\text{Substrat}$).

5.4.4 Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im Rührkesselreaktor

Eine weitere wichtige Prozessgröße ist die zur Hydrolyse eingesetzte Substratmenge. Bisher wurde eine Zuckerrübenschnitzelkonzentration von 50 g L^{-1} im mL-Maßstab betrachtet. Da im Rührkesselreaktor im L-Maßstab höhere Leistungseinträge möglich sind, konnten erhöhte Substratkonzentrationen bei der Hydrolyse untersucht werden. Bei Einsatz von Substratkonzentration $>75 \text{ g L}^{-1}$ kam es aufgrund der entstehenden Medienrheologie zu einer unzureichenden Durchmischung in den verwendeten Rührkesselreaktoren und damit zu einer eingeschränkten Hydrolyse mit verringerter Ausbeute. Aus diesem Grund sind in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Hydrolyse von 75 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln dargestellt.

Aufgrund des Einflusses des pH auf die Produktivität von *A. niger* (vgl. Kapitel 5.2.2) wurde die Hydrolyse bei dem zuvor in Versuchen bestätigten pH 4,5 durchgeführt. Die Bereitstellung des rekombinanten *A. niger* Stamms aKS055, welcher höhere Polygalacturonaseaktivitäten produziert (vgl. 5.3.2), ermöglichte es, Enzymkonzentrationen von $250\text{-}500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ zu verwenden und deren Einfluss auf die Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zu untersuchen.

Die Zuckerkonzentrationen waren bei $250 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ und $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ bis auf die Konzentration von Glucose und Xylose, Mannose, Galactose, Fructose vergleichbar (Abb. 5.4.8). Die Konzentration dieser Zucker nahm bis zum Ende der Hydrolyse (162 h) kontinuierlich zu. Bei der Freisetzung der D-GalA und Arabinose konnte ab 18 h und 25 h eine Verlangsamung der Freisetzungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Ab 48 h war der größte Teil der am Ende gelösten Zucker bereits freigesetzt. Final wurden aus 75 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel bei $250 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ $10,41 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, $12,23 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $5,26 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und $13,79 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose freigesetzt. Im Vergleich dazu wurden bei $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ nur geringfügig mehr Zucker freigesetzt: $11,43 \pm 0,30 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, $14,29 \pm ,30 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $6,22 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und $14,47 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose. Aufgrund der unveränderten Konzentration der D-Galacturonsäure nach 67 h wurde basierend auf diesem Zeitpunkt eine Raum-Zeit-Ausbeuten von $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($250 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$) und $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$) berechnet. Insgesamt wurden mit $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ 46 g L^{-1} Zuckermonomer freigesetzt, was einer Gesamtzuckerausbeute von $\sim 76 \%$ entspricht.

Die Ausbeuten mit $250 \text{ U g}_{\text{Substrat}}^{-1}$ waren: $66,6 \pm 0,3 \%$ D-Galacturonsäure, $77,3 \pm 4,1 \%$ Glucose, $86,3 \pm 4,1\%$ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und $88,1 \pm 1,5 \%$ Arabinose. Im Vergleich dazu konnten mit $500 \text{ U g}_{\text{Substrat}}^{-1}$ $70,7 \pm 1,8 \%$ D-Galacturonsäure, $84,0 \pm 1,8 \%$ Glucose, $96,8 \pm 1,2 \%$ Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose, Fructose und $90,8 \pm 2,5 \%$ Arabinose freigesetzt werden (Abb. 5.4.8).

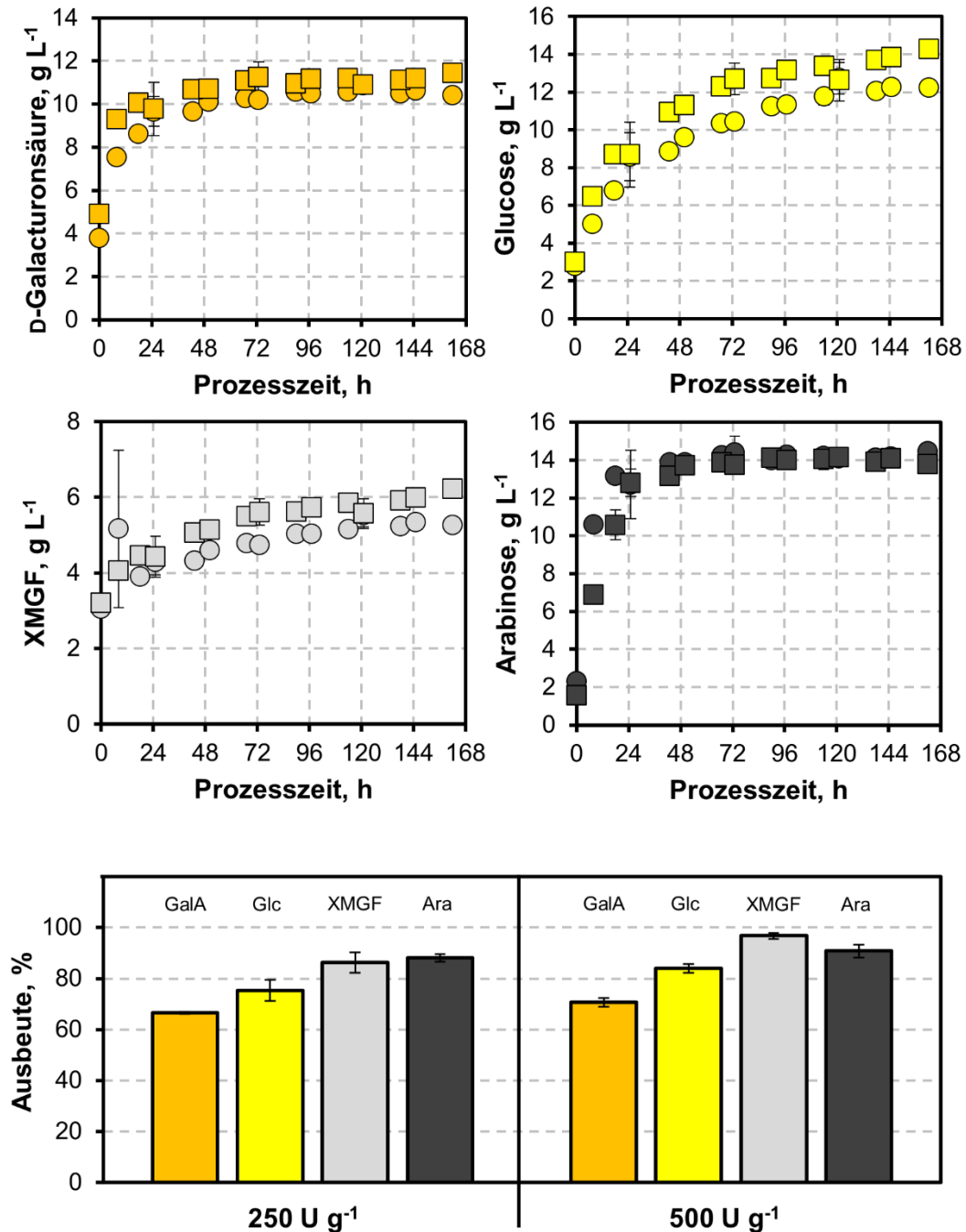


Abb. 5.4.8: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von 75 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln im Rührkesselreaktor. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentration und die finale Ausbeute von D-Galacturonsäure (GalA, orange), Glucose (Glc, gelb), Xylose-Mannose-Galactose-Fructose (XMGF, hellgrau) und Arabinose (Ara, dunkelgrau) unter Einsatz folgender Enzymkonzentrationen: $250 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ (○, Kreis) und $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ (□, Viereck). (pH 4,5, $T = 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_s = 75 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel).

5.4.5 Diskussion

An der Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln sind aufgrund der Komplexität der enthaltenen Zuckerpolymere eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen beteiligt (Semenova et al. 2019). In den Hydrolyseprozessen im mL-Maßstab wurde trotz gepuffertem Medium eine Abnahme des pH während der Hydrolyse beobachtet. Die pH Abnahme korrelierte dabei direkt mit der Zunahme der D-Galacturonsäurekonzentration. Dies ist durch den niedrigen pKs von D-Galacturonsäure von $3,51 \pm 0,01$ (20 °C) und die daraus resultierende Säurestärke zu erklären (Kohn & Kovac 1978). Bei pH 3,8 konnte eine Stabilisierung des pH trotz ansteigender D-Galacturonsäurekonzentration beobachtet werden. Im Vergleich zur Hydrolyse im Rührkesselreaktor bei konstantem pH konnte durch ein Absinken auf pH 3,8 keine Beeinflussung der Hydrolyse festgestellt werden. Dies zeigt, dass die zur Hydrolyse der Zuckerrübenschnitzel benötigten Enzyme, die mittels *A. niger* hergestellt wurden, im Bereich zwischen pH 3,8 bis pH 4,5 vergleichbar hohe Aktivität zeigen. Für die Polygalacturonase deckt sich dieser pH Bereich mit in der Literatur beschriebenen pH Optima der beiden Enzyme Polygalacturonase I und IV bei pH 3,8 - pH 4,3 und pH 3,0 – pH 4,6 (Singh & Appu Rao 2002).

Aufgrund der vergleichbaren pH Absenkung und Zuckerfreisetzung während der Hydrolysen mit unterschiedlichem Puffer ist davon auszugehen, dass die beiden Puffer Natriumacetat und Kaliumcitrat keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzel haben. Die Einflüsse von Substratkonzentration, Enzymkonzentration, Hydrolysedauer und Hydrolysetemperatur wiederum stehen in starker Wechselwirkung zueinander, sodass diese nur ganzheitlich betrachtet werden sollten.

Zu Beginn der Hydrolysen konnte ein schneller Anstieg der Zuckerkonzentrationen beobachtet werden. Innerhalb der ersten 24 h war ein großer Teil der Zucker bereits freigesetzt. Anschließend kam es zu einer Verringerung der Freisetzungsgeschwindigkeit und einem Sättigungsverhalten der Konzentrationen. Aufgrund der hohen Komplexität der Enzymmischung und des Substrats ist eine einfache kinetische Beschreibung bei der Vielzahl an ablaufenden enzymatischen Reaktionen nicht ohne weiteres möglich. Zusätzlich kommen synergistische Effekte zwischen den Enzymen hinzu, die eine einfache Beschreibung der Reaktion erschweren (Spagnuolo et al. 1997).

Anhand der Daten konnte auch beobachtet werden, dass die Maximalkonzentrationen der Zucker in Abhängigkeit der zuvor genannten Prozessvariablen zu unterschiedlichen Zeiten erreicht werden konnten. Die maximale Arabinosekonzentration wurde unter allen Bedingungen zeitlich gesehen als erstes erreicht. Anschließend folgten die D-Galacturonsäurekonzentration und die Mischung der Zucker Xylose, Mannose, Galactose und Fructose, wobei bei den genannten Zuckern auch durchaus ein Anstieg bis zum Ende der Hydrolyse beobachtet werden

konnte. Die Ausnahme hiervon war die Glucosekonzentration, die in der Langzeithydrolyse sogar bis zu 435 h weiterhin anstieg. Daran sind deutliche Unterschiede der katalytischen Effizienz der hydrolysierenden Enzyme zu erkennen. Die lange Prozesszeit zur Freisetzung von Glucose ist auf eine niedrige Cellulaseaktivität der durch *A. niger* hergestellten Enzymmischung zurückzuführen, da vor allem die darin in geringem Maße enthaltene Cellobiohydrolase zum effizienten Abbau von Cellulose benötigt wird (Patyshakuliyeva et al. 2016; Semenova et al. 2019). Zusätzlich dazu kann es aufgrund der Komplexität der in der Zellwand vorhandenen Polymere zur Behinderung des enzymatischen Abbaus kommen, sodass es zu einem sequenziellen und damit zeitlich beeinträchtigten Abbau der Polymere je nach Funktion und Lage in der Zellwand kommt (Spagnuolo et al. 1997).

Die Freisetzung der Zucker zeigte eine starke Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration und der Hydrolysetemperatur. Durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration wurde die Hydrolyseausbeute sowie die Raum-Zeit-Ausbeute verbessert. Es konnte jedoch auch festgestellt werden, dass die Verbesserung der Hydrolyseausbeute keinen linearen Zusammenhang bei Erhöhung der Enzymkonzentration zeigte. Beispielsweise konnte innerhalb der untersuchten Hydrolysezeit mit $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ nur circa 5 % mehr D-Galacturonsäureausbeute erreicht werden als mit $250 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$.

Die Erhöhung der Temperatur hatte eine Verbesserung der Hydrolysegeschwindigkeit und Ausbeute zur Folge. Dies beruht auf der temperaturbedingten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante gemäß der Arrhenius-Gleichung (Chmiel et al. 2018). Da jedoch jedes Enzym sein eigenes Temperaturoptimum und damit verbunden auch eine Thermostabilität aufweist, kam es zu unterschiedlichen Effekten auf die Freisetzung der einzelnen Zucker. Für Polygalacturonase wird in der Literatur ein, mit den Daten in dieser Arbeit übereinstimmendes, Temperaturoptimum von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ beschrieben (Pili et al. 2015). In Bezug auf Thermostabilität wurde zur Langzeitstabilitätsuntersuchung nach 276 h bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Restaktivität von $>50 \%$ bestimmt (Pili et al. 2015). Den größten Effekt hatte die Temperaturerhöhung allerdings auf die Freisetzung der Glucose. Damit konnten die zuvor bestimmten Aktivitätsdaten der Cellulase in Abhängigkeit der Temperatur bestätigt werden.

Substratkonzentrationen von $> 75 \text{ g L}^{-1}$ konnten mit den verwendeten Rührkesselreaktoren nicht effizient hydrolysiert werden. Aufgrund der hohen Wasseraufnahmekapazität der Zuckerrübenschnitzel kommt es zu einer erhöhten Medienviskosität, die eine Durchmischung erschwert und damit zu einer unvollständigen Hydrolyse mit verschlechterter Ausbeute führt. In der Literatur werden jedoch durchaus Prozesse mit höheren Zuckerrübenkonzentrationen als Substrat für eine Hydrolyse eingesetzt (Semenova et al. 2019).

Während der Hydrolyseuntersuchung konnte keine Rhamnose oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden. Dies widerspricht der durchgeführten Zusammensetzungsanalyse (6,8 % Rhamnose) und der Zusammensetzung aus der Literatur, da die in Pektin enthaltenen Polymere Rhamnogalacturonan I und Rhamnogalacturonan II rhamnosereiche Strukturen sind (Glass et al. 2013; Mohnen 2008). Dies könnte an einer fehlenden spezifischen Enzymaktivität in der durch den verwendeten *A. niger* Stamm hergestellten Enzymmischung liegen. Diese Annahme könnte auch eine Erklärung für die unvollständige Freisetzung von D-Galacturonsäure sein. Es ist jedoch beschrieben, dass bestimmte *A. niger* Stämme befähigt sind, die zum Abbau des Rhamnogalacturonan I benötigten Enzyme zu produzieren (Benoit et al. 2012; Glass et al. 2013).

In der Literatur wird eine Vielzahl an Vorbehandlungsmethoden beschrieben, die die Hydrolyseeffizienz erhöhen können (Kracher et al. 2014; Kühnel et al. 2011; Li et al. 2020; Zheng et al. 2013). Aufgrund der hohen Hydrolyseausbeute wurde jedoch außer einer thermischen Vorbehandlung während der Sterilisation bei 121°C für 20 min keine weitere Vorbehandlung durchgeführt. Bei Einsatz einer Vorbehandlung sind die Labilität des gewünschten Produkts D-Galacturonsäure sowie der Arabinose bei zu hohen Temperaturen und saurem pH und der dadurch zusätzlich benötigte Prozessschritt zu bedenken (Kühnel et al. 2011).

Da ein Großteil der Forschung zur Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln auf die reine Verflüssigung der Biomasse zur weiteren Verwendung als Substrat in biotechnologischen Prozessen abzielt, gibt es oft nur Angaben zur Gesamtzuckerausbeute. Diese liegt normalerweise bei einem Einsatz von bis zu 100 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel bei 70 % bis 100 % (Berlowska et al. 2018b; Concha Olmos & Zúñiga Hansen 2012; Micard et al. 1996). Aufgrund des Interesses an der Biotransformation der Monomere D-Galacturonsäure und Arabinose gibt es auch spezifische Daten zu deren Ausbeute, sodass es gelungen ist bis zu 80 % D-Galacturonsäureausbeute und zwischen 70 % - 80 % Arabinoseausbeute nach der Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln zu erreichen (Leijdekkers et al. 2013; Micard et al. 1996).

Bei den Untersuchungen konnten Hydrolysebedingungen ermittelt werden, mit denen bis zu ~ 70 % der D-Galacturonsäure aus den Zuckerrübenschnitzeln herausgelöst werden. Bei einem Einsatz von 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel können demnach bis zu 11 g L⁻¹ D-Galacturonsäure freigesetzt werden.

5.5 Gekoppelte Polygalacturonaseproduktion und enzymatische Hydrolyse

Zur Prozessintegration von Enzymproduktion und enzymatischer Hydrolyse von Agrarreststoffen zur Herstellung von D-Galacturonsäure wurden die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen zusammengeführt.

5.5.1 Voruntersuchungen

Um eine ökonomisch effiziente Hydrolyse durchführen zu können, muss eine möglichst hohe Substratkonzentration eingesetzt werden. Da jedoch hohe Konzentrationen des Substrats Zuckerrübenschnitzel ($> 50 \text{ g L}^{-1}$) aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität zu einer rheologisch anspruchsvollen Suspension führen, wurde zunächst ein neues Rührerkonzept erarbeitet, um eine homogene Durchmischung während der Kultivierung von *A. niger* und der Hydrolyse hoher Zuckerrübenschnitzelkonzentrationen zu ermöglichen. Hierzu wurde das Mischzeitverhalten von drei verschiedenen Rührerkonfigurationen A, B und C (Kapitel 4.3.5), bestehend aus Sechsstabscheibenrührer (Rushton-Turbine, radial fördernd) und Schrägblattrührer (axial fördernd mit Radialanteil) mittels Aufnahme von Sprungfunktionen nach Zugabe von Säure und Base in einer 70 %-igen Glycerinlösung untersucht.

In Tabelle 5.5.1 sind die bestimmten Mischzeiten θ_{90} der untersuchten Rührerkonfigurationen dargestellt. Bei der Mischzeitbestimmung zeigten sich deutliche Unterschiede: Mit Konfiguration B konnte, im Vergleich zur zuvor standardmäßig verwendeten Konfiguration A, die Mischzeit um 34 % reduziert werden. Bei Verwendung der Konfiguration C wurde eine Mischzeitreduktion um 18 % beobachtet.

Tabelle 5.5.1: Mischzeiten θ_{90} unterschiedlicher Rührerkonfigurationen (Tabelle 4.3.1 und Abb. 4.3.3) im 7,5 L Maßstab bei 600 min^{-1} .

Rührerkonfiguration	Mittelwert Mischzeit θ_{90} , s		
	A	B	C
	$196,67 \pm 29,14$	$130,00 \pm 9,85$	$160,67 \pm 11,59$

Während der Mischzeituntersuchungen zeigte Konfiguration B eine deutlich effektivere Durchmischung im viskosen Referenzmedium ($\sim 27 \text{ mPa s}$ bei 20°C) und wurde deshalb in der Kultivierung mit *A. niger* mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel und einer Rührerdrehzahl von 600 min^{-1} eingesetzt und mit der zuvor standardmäßig verwendeten Rührerkonfiguration A verglichen. Rührerkonfiguration B wurde darüber hinaus mit 50 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel verwendet. Zur Bewertung wurde die sekretierte Proteinmenge und die generierte

Polygalacturonasekonzentration betrachtet (Abb. 5.5.1). Während der Satzprozesse wurde der Wildtypstamm *A. niger* ATCC11414 verwendet.

Der Verlauf der Proteinkonzentrationen der Satzprozesse mit 30 g L^{-1} zeigte ähnliche Verläufe. Dabei nahm die Proteinkonzentration während der Kultivierung mit Rührerkonfiguration B bis 24 h Prozesszeit schneller ab als im Referenzprozess mit Rührerkonfiguration A. Anschließend wurde mit Konfiguration B mehr Protein sekretiert, sodass finale Proteinkonzentrationen von $306,74 \pm 37,13 \text{ mg L}^{-1}$ (Rührerkonfiguration A) und $407,74 \pm 24,91 \text{ mg L}^{-1}$ (Rührerkonfiguration B) erreicht werden konnten. Im Versuch mit 50 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln konnte durch eine höhere Menge an eingebrachten Zuckerrübenproteinen eine höhere Proteinkonzentration zu Beginn der Kultivierung beobachtet werden. Nach Abnahme der im Medium gelösten Proteine bis 57 h wurde bis zum Ende der Kultivierung eine Proteinkonzentration von $526,53 \pm 24,95 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen.

Die Polygalacturonaseaktivität zeigte eine deutliche Beeinflussung durch die verwendete Rührerkonfiguration und vorgelegte Zuckerrübenschnitzelmenge. So konnte die Polygalacturonaseaktivität innerhalb der letzten 8 h mit Rührerkonfiguration B final auf $14,04 \pm 1,03 \text{ U mL}^{-1}$ gesteigert werden, wohingegen es bei Konfiguration A in diesem Zeitraum zu einer Abnahme der Aktivität auf $11,60 \pm 0,78 \text{ U mL}^{-1}$ kam. Eine Erhöhung der Zuckerrübenschnitzelkonzentration hatte einen negativen Effekt auf die Polygalacturonaseaktivität. In diesem Versuch konnten nur $6,19 \pm 0,97 \text{ U mL}^{-1}$ Polygalacturonaseaktivität erzeugt werden.

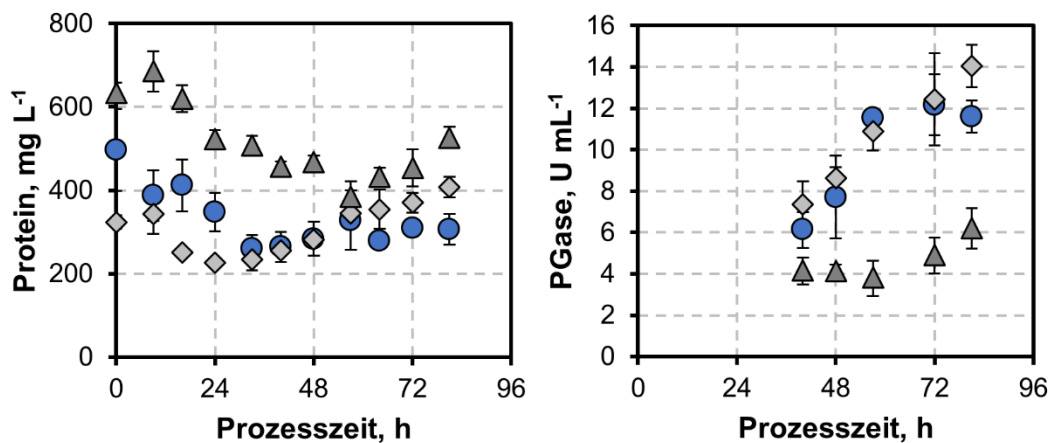


Abb. 5.5.1: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Satzkultivierungen des *A. niger* Basistamms ATCC 11414 mit unterschiedlicher Rührerkonfiguration und Substratkonzentration. Untersucht wurden zwei Rührerkonfigurationen bestehend aus: (A) drei Scheibenrührern (Rushton-Turbine) und (B) einem Scheibenrührer (Rushton-Turbine) nahe des Begasungsorgans gefolgt von zwei Schrägblattrührern (Kapitel 4.3.5). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinkonzentration und der Polygalacturonaseaktivität (PGase) während Kultivierungen mit Rührerkonfiguration A & $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ (●, blau), Rührerkonfiguration B & $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ (◇, hellgrau) und Rührerkonfiguration B & $c_s = 50 \text{ g L}^{-1}$ (▲, dunkelgrau) ($n = 600 \text{ min}^{-1}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $V_R = 3 \text{ L}$, $\text{pH } 4,5$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Nach Verifizierung des positiven Einflusses der Rührerkonfiguration B in Kombination mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln, sollte diese auch für den rekombinanten Stamm *A. niger* aKS055 zum Einsatz kommen. Dazu wurden zwei Kultivierungen im 7,5 L-Maßstab durchgeführt und mit den besten Ergebnissen aus dem 1,5 L-Maßstab verglichen. Die Ergebnisse der Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität im Medienüberstand sind in Abb. 5.5.2 dargestellt. In beiden Maßstäben wurden, je nach Rührerkonfiguration, Rührerspitzen- geschwindigkeiten für die Sechsblasscheibenrührer von $1,45\text{-}1,70 \text{ m s}^{-1}$ und für den im 7,5 L-Maßstab verwendeten Schrägblattrührer von $2,04 \text{ m s}^{-1}$ verwendet.

Die drei verglichenen Kultivierungen zeigten bezogen auf die sekretierte Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität vergleichbare Ergebnisse. Final lagen im 7,5 L-Maßstab nach 82 h im Mittel $838,02 \pm 141,21 \text{ mg L}^{-1}$ Protein und $148,86 \pm 11,54 \text{ U mL}^{-1}$ Polygalacturonaseaktivität im Medium vor. Im Vergleich dazu konnte im 1,5 L-Maßstab in der gleichen Zeit $873,58 \pm 32,41 \text{ mg L}^{-1}$ Protein und $141,12 \pm 6,64 \text{ U mL}^{-1}$ Polygalacturonase erzeugt werden. Anhand der Daten konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse aus dem 1,5 L Maßstab im 7,5 L Maßstab mehrfach reproduziert werden konnten.

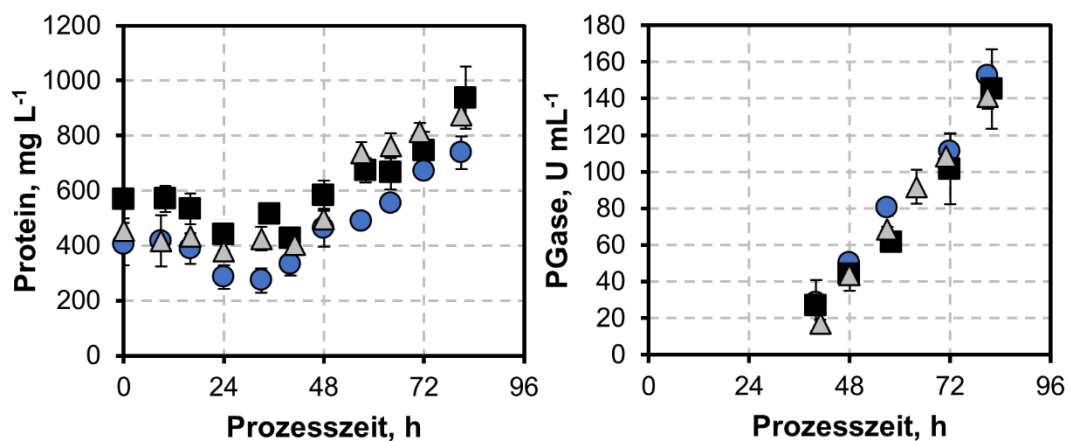


Abb. 5.5.2: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Satzkultivierungen des *A. niger* Produktionsstamms aKS055 im 0,7 und 3 L Maßstab. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinkonzentration und der Polygalacturonaseaktivität (PGase) von *A. niger* aKS055 während der Kultivierung im 0,7 L Maßstab als Referenz (Δ , dunkelgrau) und im 3 L Maßstab mit Rührerkonfiguration B (Prozess I \blacksquare , schwarz; Prozess II \bullet , blau). ($T = 30^\circ\text{C}$, $P \text{ V}^{-1} = \sim 3 \text{ W L}^{-1}$ (600 min^{-1}), $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ bis } 2 \text{ vvm}$, $c_s = 30 \text{ g L}^{-1}$ Zuckerrübenschnitzel, $\text{pH } 4,5$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Diskussion

Bei der Verwendung von Zuckerrübenschnitzeln als Substrat in der Submerskultivierung müssen die rheologischen Anforderungen der dabei entstehenden Suspension beachtet werden. Hinzu kommen die Viskositätsänderung des Mediums im Verlauf der Kultivierung von filamentösen Pilzen durch die sich entwickelnde Morphologie der Mikroorganismen (Papagianni 2004). Um während des Prozesses einen ausreichenden Massentransfer zu

gewährleisten, muss der verwendete Reaktor für eine gute Suspendierung, Homogenisierung und Sauerstoffdispergierung im Medium sorgen (Chmiel et al. 2018; Zlokarnik 2013).

Bei der angestrebten Verwendung hoher Substratkonzentrationen muss durch das Rührorgan ein ausreichender Massentransport gewährleistet werden, da die Reaktionsgeschwindigkeiten sonst negativ beeinflusst werden können (Corrêa et al. 2016). Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurden in der Literatur verschiedene Rührerkonzepte, bestehend aus Sechsstabscheibenrührer und Schrägblattrührer untersucht. Dabei konnte mit einer Rührerkonfiguration aus zwei Schrägblattrührern, mit bestimmten Strömungsrichtungen, ein hoher Sauerstoffeintrag in Verbindung mit einer niedrigen Scherwirkung bei niedrigerem Leistungseintrag realisiert werden (Bustamante et al. 2013; Corrêa et al. 2016).

Auf Basis dieser Literaturdaten wurden Rührerkonfigurationen untersucht und in den beschriebenen Prozessen angewandt. Zudem wurde ein Sechsstabscheibenrührer nahe des Begasungsorgans eingebaut, da Schrägblattrührer in nicht-newtonschen Flüssigkeiten eine schlechtere Gaszerteilung vorweisen und damit den Sauerstofftransport verschlechtern können (Zlokarnik 2013). Auch in der Literatur wird die Konfiguration aus Sechsstabscheibenrührer zur Sauerstoffdispergierung und Schrägblattrührer zur Homogenisierung bei der Kultivierung filamentöser Mikroorganismen beschrieben (Meyer & Schmidhalter 2014).

Während der Mischzeituntersuchungen zeigte Rührerkonfiguration B, welche ausgehend vom Ende der Rührachse aus einem Sechsstabscheibenrührer, einem Schrägblattrührer abwärtsfördernd sowie einem Schrägblattrührer aufwärtsfördernd bestand, eine deutlich effektivere Durchmischung im viskosen Referenzmedium. Diese Verkürzung der Mischzeit ist analog zu Literaturangaben. Dort wurde für eine ähnliche Anordnung aus zwei Schrägblattrührern ebenfalls die niedrigsten Mischzeiten bestimmt (Corrêa et al. 2016).

Die verringerte Mischzeit in Verbindung mit einem verbesserten Massentransport führte im Kultivierungsprozess zu einer Verlängerung der Produktivität von *A. niger*. Durch den Austausch zweier Sechsstabscheibenrührer durch Schrägblattrührer konnte eine gleichmäßigere Energiedissipation erreicht werden, da für Schrägblattscheibenrührer eine insgesamt gleichmäßigere und lokal am Rührerblatt niedrigere Energiedissipation beschrieben wird (Chmiel et al. 2018; Kraume 2002).

Die durch Änderung der Rührerkonfiguration hervorgerufenen Verbesserung der Mischzeit und des Massentransports erwies sich allerdings als unzureichend, um gegenläufige Effekte durch eine höhere Substratkonzentration (50 g L^{-1}) auszugleichen. Aufgrund der in diesen Prozessen beobachteten, deutlich geringeren Produktivität von *A. niger*, ist der Einsatz höherer Substratkonzentrationen als Verfahrensansatz zur Steigerung der Produktion pektinolytischer Enzyme ungeeignet.

5.5.2 Prozessintegration

Die Prozessintegration wurde über einen Zweiphasenprozess zur Freisetzung von D-Galacturonsäure realisiert. Dabei wurde nach Abschluss des etablierten Enzymproduktionsprozesses mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln bei 30 °C eine Feststoffzugabe sterilisierter Zuckerrübenschnitzel (75 g L^{-1}) durchgeführt. Zur Vorbereitung der aseptischen Zugabe wurden Zuckerrübenschnitzel zunächst bei 121 °C für 30 min trocken autoklaviert und unter aseptischen Bedingungen in einen Trichter überführt, der mittels eines Schlauchs mit Anschlussstück an den Rührkesselreaktor angeschlossen werden konnte. Nach Zugabe der sterilisierten Zuckerrübenschnitzel wurde Kanamycin (50 mg L^{-1}) zur Unterbindung eines Fremdkeimwachstums hinzugegeben und die Kultivierungstemperatur auf die Hydrolysetemperatur von 50 °C erhöht. Sowohl vor als auch nach Zugabe wurde eine Probe des Kultivierungsmediums auf ihre Zuckerkonzentration hin analysiert.

Das Wachstum von *A. niger* während der Prozessintegration wurde anhand der respiratorischen Aktivität verfolgt (Abb. 5.5.3). Während der Kultivierung wurden ähnliche Kurvenverläufe wie in den Voruntersuchungen beobachtet. Dabei stieg die Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER, carbon dioxide evolution rate) nach 30 h maximal auf $1,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an. Die Sauerstoffaufnahme (OUR, oxygen uptake rate) zeigte ihren Maximalwert von $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 28 h . Nach dem Stop der Begasung und Umstellung der Temperatur auf 50 °C zur Initiierung der Hydrolyse fielen die CER und OUR auf $0 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab.

In der Enzymproduktionsphase produzierte *A. niger* bis 83 h $911,47 \pm 129,39 \text{ mg L}^{-1}$ Protein und eine Polygalacturonaseaktivität von $146,23 \pm 10,67 \text{ U mL}^{-1}$ (Abb. 5.5.3). Über die gesamte Kultivierungsdauer wurde der Verlauf der Zuckerkonzentration im Medium gemessen (Abb. 5.5.3). Während der Enzymherstellung konnte der charakteristische zeitliche Verlauf der Zuckerkonzentrationen beobachtet werden.

Nach Zugabe der Zuckerrübenschnitzel nach 83 h und Temperaturerhöhung auf 50 °C war ein Anstieg der freien Monosaccharide im Medium zu beobachten. Innerhalb der ersten 8 h nach Start der Hydrolyse konnte eine schnelle Freisetzung aller untersuchten Zuckermonomere beobachtet werden, wobei die Konzentrationen von D-Galacturonsäure und Arabinose schneller zunahmen als die Konzentrationen von Glucose und der Zuckermischung um Xylose. Anschließend konnte eine deutliche Reduktion der Freisetzungsgeschwindigkeiten von D-Galacturonsäure und Arabinose analog zu den Voruntersuchungen beobachtet werden. Die Konzentrationen von Glucose und der Zucker Xylose, Galactose, Mannose und Fructose nahmen bis zum Ende der Hydrolyse kontinuierlich zu.

Anhand der Respirationsraten und der zunehmenden Zuckerkonzentration während der Hydrolysephase ist anzunehmen, dass durch den Begasungsstopp und die Temperaturerhöhung von 30°C auf 50°C das Wachstum von *A. niger* erfolgreich unterbunden wurde.

Final wurden somit aus 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzeln (~ 5 % Verlust beim aseptischen Transfer des Substrats) 10,71 g L⁻¹ D-Galacturonsäure, 13,58 g L⁻¹ Glucose, 5,45 g L⁻¹ Xylose, Mannose, Galactose, Fructose sowie 12,99 g L⁻¹ Arabinose freigesetzt (Abb. 5.5.3). Mit 10,71 g L⁻¹ D-Galacturonsäure innerhalb von 71 h wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,15 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Es konnten Ausbeuten von 69 % D-Galacturonsäure, 84 % Glucose, 89 % Mischung aus Xylose, Mannose, Galactose, Fructose sowie 84% Arabinose bestimmt werden (Abb. 5.5.3). Die Gesamtzuckerausbeute bezogen auf die verfügbaren Zucker lag mit 42,64 g L⁻¹ bei 73 %.

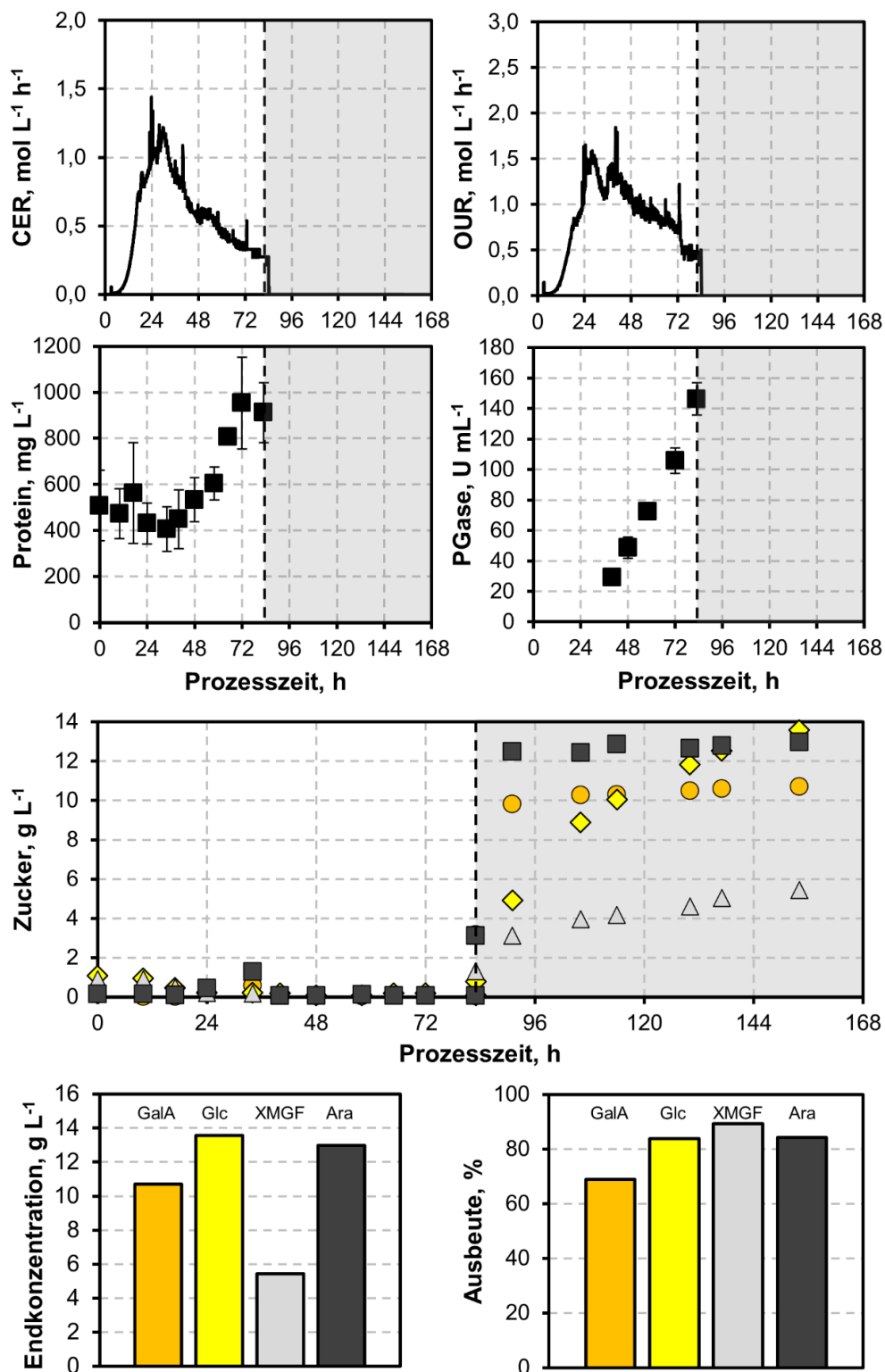


Abb. 5.5.3: Prozessdaten der gekoppelten Polygalacturonaseproduktion und enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im Satzverfahren. Nach 83 h wurden die Hydrolyse durch aseptische Zugabe von 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel und Temperaturerhöhung auf 50 °C gestartet (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme rate (OUR), Proteinkonzentration, Polygalacturonaseaktivität (PGase), Zuckerkonzentration und Ausbeute während der gekoppelten Polygalacturonaseproduktion und enzymatischen Hydrolyse mit *A. niger* aKS055: D-Galacturonsäure (GalA, ●, orange), Glucose (Glc, ◆, gelb), Xylose-Mannose-Galactose-Fructose (XMGF, △, hellgrau), Arabinose (Ara, ■, dunkelgrau). (pH 4,5, P V⁻¹ = ~3 W L⁻¹(600 min⁻¹), V_R = 4 L).

Diskussion

Zur Realisierung der gekoppelten Produktion pektinolytischer Enzyme mit nachfolgender enzymatischer Hydrolyse im Satzverfahren wurden im Verlauf dieser Arbeit Untersuchungen im 1,5 L und 7,5 L-Maßstab durchgeführt. Ein ähnlicher Ansatz wird in der Literatur unter dem Begriff „simultaneous saccharification and fermentation“ (SSF) beschrieben, bei dem jedoch das zu hydrolysierende Substrat schon zu Prozessbeginn im Medium vorliegt, sodass die eingesetzten Mikroorganismen die freigesetzten Zucker verstoffwechseln oder zu dem gewünschten Produkt umsetzen können (Devos & Colla 2022). Die Anwendbarkeit dieser Verfahrensvariante wird vornehmlich bei der Herstellung von Bioethanol und Aceton-Butanol-Ethanol aus lignocellulosehaltigen Agrarreststoffen untersucht (Ask et al. 2012; Olofsson et al. 2008; Sasaki et al. 2014).

Es gibt jedoch auch Untersuchungen, bei denen Zuckerrübenschnitzel als Substrat verwendet wurden. Berlowska et al. (2018b) konnten zeigen, dass sich die Ausbeute bei der Umsetzung hydrolysierter Zucker zu Lactat mittels eines SSF-Verfahrens um 80-90 % steigern lässt im Vergleich zu einem Verfahren, in dem Kultivierung und Hydrolyse separat durchgeführt wurden. Als Vorteile dieses Verfahrens werden niedrigere Investitionskosten aufgrund eingesparter Prozessschritte, kürzere Gesamtprozesszeiten und eine niedrigere Enzyminhibition aufgrund der simultanen Verstoffwechslung der Zucker durch den Produktionsorganismus beschrieben. Diese Verfahrensvariante konnte aufgrund der Metabolisierung des gewünschten Zielmoleküls D-Galacturonsäure durch die eingesetzten *A. niger* Stämme nicht angewendet werden. Durch die dargestellte gekoppelte Enzymproduktion und Hydrolyse ist es prinzipiell auch möglich, die Gesamtprozesszeit, den Arbeitsaufwand (keine Biomasseabtrennung) und die Investitionskosten zu verringern.

Bei dem gekoppelten Verfahren konnte die Hydrolyse mit $1,946 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ gestartet werden. Damit war die Enzymkonzentration um das Vierfache höher als in den Voruntersuchungen im 1,5 L-Maßstab. Dennoch konnten keine signifikanten Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit und der Ausbeute beobachtet werden.

Die hohe pektinolytische Aktivität eröffnet die Möglichkeit, mittels eines einzigen Produktionsprozesses eine weitaus höhere Menge an Zuckerrübenschnitzel effizient zu hydrolysieren. Dazu kann die Zugabe von Zuckerrübenschnitzeln zu einem früheren Prozesszeitpunkt durchgeführt werden, bei dem eine ausreichende Enzymaktivität vorliegt. Im gezeigten Verfahren ist nach 48 h mit $48,66 \pm 6,85 \text{ U mL}^{-1}$ ausreichend Polygalacturonaseaktivität vorhanden um die eingesetzte Substratmenge von 75 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel mit einer Enzymkonzentration von $640 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ zu hydrolysieren (vgl. $500 \text{ U g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ in den Versuchen im 1,5 L-Maßstab).

Außerdem ist eine Verkürzung der Hydrolysezeit eine Option zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute. Bereits nach 24 h sind mit $10,3 \text{ g L}^{-1}$ 96 % der maximalen D-Galacturonsäure freigesetzt. Die beiden zuvor genannten Anpassungen könnten somit zu einer erheblichen Effizienzsteigerung des Verfahrens führen, sodass mit dem gekoppelten Verfahren bereits nach 72 h eine annähernd maximale D-Galacturonsäurekonzentration freigesetzt werden kann.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Prozessierung von Zuckerrüben fallen in Deutschland jährlich etwa 1,5 Mio. Tonnen Zuckerrübenpressschnitzel als Agrarreststoff an. Zu einem großen Teil werden sie als Futtermittel verwendet, thermisch verwertet oder lediglich in Deponien endgelagert (Berlowska et al. 2015; Ptak et al. 2022). Dabei bieten sie sich aufgrund ihres hohen Anteils an Polysacchariden (bis zu 80%) bei niedrigem Ligningehalt für eine weitere biotechnologische Verwertung als vielversprechendes Substrat an. Von besonderem Interesse ist das enthaltene Pektin (~25 -30 %) und dessen Hauptmonomer, D-Galacturonsäure, welches als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Plattformchemikalien Verwendung finden kann (Finkensstadt 2014; Richard & Hilditch 2009; Schmitz et al. 2019).

Zur stofflichen Nutzung des Pektins der Zuckerrübenschnitzel wird aufgrund der hohen Komplexität der enthaltenen Zuckerpolymere ein speziell angepasstes pektinolytisches Enzymgemisch benötigt. Da die Hauptanwendungsgebiete für pektinolytische Enzymgemische hauptsächlich in der Nahrungsmittel- und Textilindustrie liegen, war es Ziel dieser Arbeit, ein Verfahren zur Herstellung pektinolytischer Enzyme mit *A. niger* zur Freisetzung von D-Galacturonsäure aus Zuckerrübenschnitzeln zu erarbeiten, um durch eine effiziente Nutzung der Zuckerrübenschnitzel einen ökologischen Mehrwert generieren zu können. Dazu wurden die drei Ziele: Produktion pektinolytischer Enzyme mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger*, Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln zur Freisetzung von D-Galacturonsäure und die Koppelung beider Prozesse im Sinne einer Prozessintegration verfolgt.

Zu Beginn der Untersuchung zur Herstellung pektinolytischer Enzyme wurde ein Standardverfahren mit Zitruspektin als Kohlenstoffquelle mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* zur reproduzierbaren Kultivierung etabliert. Zur Identifikation eines geeigneten Produktionsstammes wurden die sechs *A. niger* Stämme NRRL 3, N402, NRRL3122, CBS 513.88, ATCC 1015 und ATCC 11414 vergleichend charakterisiert. Für eine Vorauswahl wurden die sechs Stämme im Schüttelkolben kultiviert und deren Polygalacturonaseaktivität als Auswahlkriterium herangezogen. Dabei zeigten die beiden *A. niger* Stämme NRRL3122 und CBS 513.88 die niedrigste Polygalacturonaseaktivität und wurden deshalb nicht bei der im Anschluss durchgeführten Charakterisierung unter kontrollierten Bedingungen im Rührkesselreaktor berücksichtigt. Während des Stammvergleichs im Rührkesselreaktor zeigten die *A. niger* Stämme NRRL 3, N402, ATCC 1015 und ATCC 11414 deutliche Unterschiede bezüglich ihres Wachstums, ihrer Proteinsekretion und ihrer Polygalacturonaseaktivität. Auch bei der Analyse der Pilzmorphologie konnten Unterschiede festgestellt werden, da sowohl pelletartiges Wachstum als auch frei dispers, myzelartiges Wachstum beobachtet werden konnte. Der dispers myzelartig wachsende Stamm *A. niger* ATCC 11414 konnte trotz seines langsameren

Wachstums und der niedrigeren, sekretierten Proteinmenge die höchste Polygalacturonaseaktivität von $1,52 \pm 0,04 \text{ U mL}^{-1}$ produzieren. Aus diesem Grund wurde dieser *A. niger* Stamm für die weiteren Untersuchungen zur Sekretion pektinolytischer Enzyme ausgewählt und als Basisstamm verwendet.

Aufgrund des starken Zusammenhangs der pilzlichen Morphologie mit seiner Produktivität wurde der Einfluss des rührerinduzierten, volumetrischen Leistungseintrags auf die Morphologie und Polygalacturonaseaktivität von *A. niger* ATCC 11414 untersucht. Dazu kamen volumetrische Leistungseinträge von $1,86 \text{ W L}^{-1}$ bis $4,95 \text{ W L}^{-1}$ durch Einstellung unterschiedlicher Rührerdrehzahlen zum Einsatz. Die Erhöhung des volumetrischen Leistungseintrags hatte eine Verringerung und Verzögerung des Erreichens der maximalen Biotrockenmassekonzentration zur Folge. Der Leistungseintrag zeigte starken Einfluss auf die Pilzmorphologie. Mit zunehmendem Leistungseintrag verändert sich die Morphologie von dispersem Myzel (niedriger Leistungseintrag) hin zu sphärischen Pellets (hoher Leistungseintrag). Bei der Betrachtung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand zeigte der Satzprozess mit einem Leistungseintrag von $2,93 \text{ W L}^{-1}$ nach 72 h mit $1,92 \pm 0,14 \text{ U mL}^{-1}$ die höchste Aktivität. Die Satzprozesse mit Leistungseinträgen unterhalb und oberhalb von $2,93 \text{ W L}^{-1}$ zeigten geringere Polygalacturonaseaktivitäten. Durch Ermittlung des geeigneten Leistungseintrags konnte so die Polygalacturonaseaktivität von *A. niger* ATCC 11414 um circa 20 % gesteigert werden.

Während der Substratumstellung auf Zuckerrübenschnitzel wurde der Einfluss der Variablen Substratkonzentration (Zuckerrübenschnitzel), pH während der Kultivierung, Stickstoffbereitstellung und Inokulationskonzentration mittels Parameterstudien im Rührkesselreaktor untersucht. In einem untersuchten Bereich von 20 g L^{-1} bis 35 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel konnte mit einer Substratkonzentration von 30 g L^{-1} die höchste Polygalacturonaseaktivität von $11,06 \pm 2,04 \text{ U mL}^{-1}$ im Satzverfahren gemessen werden. Eine Variation des pH auf pH 3, pH 6 und ohne pH Regelung während der Satzkultivierung zeigte keine Verbesserung der Polygalacturonaseaktivität gegenüber dem Standardprozess bei pH 4,5.

Nachfolgend wurde der Einfluss einer einfachen und fünffachen Stickstoffkonzentration (bezogen auf die molekulare Menge an Stickstoff des Standardprozesses) der Stickstoffquellen Natriumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff, Ammoniumdihydrogenphosphat und Ammoniumchlorid auf die Enzymproduktion untersucht. Durch den Einsatz der fünffachen Ammoniumsulfatkonzentration konnte die Polygalacturonaseaktivität im Satzverfahren auf $19,55 \pm 1,87 \text{ U mL}^{-1}$ gesteigert werden (Vergleich Standard-Satzprozess mit Natriumnitrat: $8,73 \pm 1,58 \text{ U mL}^{-1}$). Da in den Vergleichsprozessen mit Ammoniumdihydrogenphosphat und Ammoniumchlorid niedrigere Polygalacturonaseaktivitäten produziert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass Sulfat als Gegenion einen positiven Effekt auf die Enzymsekretion ausübt.

Die Variation der Inokulationsdichte von 10^7 , 10^8 und 10^9 Sporen L^{-1} zeigte im Satzverfahren einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und damit auch auf die Polygalacturonaseproduktion. Mit der initialen Sporenkonzentration von 10^9 Sporen L^{-1} konnte die höchste finale Polygalacturonaseaktivität von $22,64 \pm 3,00$ U mL^{-1} erreicht und damit diese Inokulationskonzentration bestätigt werden.

Insgesamt konnte mit Hilfe dieser Parameterstudie, in der das Substrat und dessen Konzentration, der pH, die Stickstoffversorgung und die Inokulationsdichte evaluiert wurden, eine zwölfwache Steigerung der Polygalacturonaseaktivität von $1,92 \pm 0,14$ U mL^{-1} auf $22,64 \pm 3,00$ U mL^{-1} erreicht werden (Abb. 6.1.1).

Anschließend wurden sechs rekombinante Stämme, die von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft (Technische Universität München, Prof. Dr. J. Philipp Benz) bereitgestellt wurden, unter den zuvor evaluierten Bedingungen im Rührkesselreaktor reaktionstechnisch charakterisiert. Der zur genetischen Modifikation vorbereitete Ausgangstamm *A. niger* aKS039 zeigte im Vergleich zu seinem parentalen Wildtypstamm *A. niger* ATCC 11414 keine Unterschiede in der Polygalacturonasesekretion. Die weiteren, auf *A. niger* aKS039 basierenden, vier rekombinanten *A. niger* Stämme aKS055, aKS056, aKS057 und aKS058 besitzen jeweils einzelne genetische Anpassungen im Hinblick auf die konstitutive Produktion von Pektinasen (aKS055), die Anpassung der Kohlenstoffkatabolitrepression (aKS057), die verbesserte Sekretionsfähigkeit durch Morphologieveränderung (aKS056) und den verringerten Abbau von sekretierten Proteinen (aKS058). Im 1,5 L Parallelrührkesselreaktor zeigte *A. niger* aKS055 mit $141,12 \pm 6,64$ U mL^{-1} die höchste Polygalacturonaseaktivität (ca. sechsfach höher als der Wildtyp ATCC 11414) und wurde deshalb vom Projektpartner als neuer Basisstamm für weitere genetische Modifikationen ausgewählt (Abb. 6.1.1). Mit der Deletion zweier orthologer D-Galacturonsäure-Reduktasen im *A. niger* Stamm aKS090 sollte die Metabolisierung von D-Galacturonsäure verhindert werden. Trotz einer ähnlich hohen Polygalacturonaseaktivität konnte allerdings keine erhöhte Konzentration an D-Galacturonsäure im Kultivierungsüberstand nachgewiesen werden.

Parallel zur Arbeit am Herstellungsverfahren pektinolytischer Enzyme wurde an der, im zweiten Prozessschritt essenziellen, Hydrolyse des Substrats Zuckerrübenschnitzel gearbeitet. Das primäre Ziel dieser Hydrolyse war die vollständige Freisetzung der D-Galacturonsäure, um eine ökonomisch erfolgreiche Weiterverarbeitung der Zuckersäure zu ermöglichen. Neben der Freisetzung von D-Galacturonsäure wurde auch die Freisetzung der weiteren Zuckermomere charakterisiert. Als Voraussetzung zur Bestimmung der Hydrolyseeffizienz oder Hydrolyseausbeute wurde als Erstes eine Totalhydrolyse und Bestimmung der Zusammensetzung der verwendeten Substratcharge Zuckerrübenschnitzel durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung des hergestellten Enzymgemischs wurde dessen Produktinhibierung durch die bei

der Hydrolyse freigesetzten Zucker mittels einer dafür etablierten Viskositätsabnahmeuntersuchung evaluiert. Dabei konnte unter den untersuchten Bedingungen keine Inhibition der Enzyme durch die in den Zuckerrübenschnitzeln enthaltenen Zuckermonomere beobachtet werden.

Nach Abschluss der beiden wichtigen Voruntersuchungen, wurde zunächst der Einfluss der Prozessvariablen: Puffersubstanz (Kaliumcitrat, Natriumacetat), Hydrolysedauer (bis zu 21 Tage) und Temperatur (30 °C und 50 °C) bei einer Substratkonzentration von 50 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzeln im mL-Maßstab untersucht. Die eingesetzten Puffersubstanzen Natriumacetat und Kaliumcitrat zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse, sodass die anschließenden Hydrolyseprozesse mit Kaliumcitrat durchgeführt wurden. Mit Hilfe einer Langzeithydrolyse wurde im Satzverfahren der Faktor Zeit auf die Ausbeute untersucht. Bis zur 293 h kam es zur Zunahme der Zuckerkonzentration. Ab diesem Zeitpunkt wurde keine deutliche Zunahme mehr beobachtet, sodass auch nach 507 h eine D-Galacturonsäureausbeute von 69 % (7,48 g L⁻¹ D-Galacturonsäure) nicht überschritten wurde. Während der Hydrolyse bei 30°C mit einer Polygalacturonasekonzentration von 100 U g⁻¹_{Substrat} konnten mit 5,74 ± 0,28 g L⁻¹ freigesetzter D-Galacturonsäure eine Ausbeute von 53 % erreicht werden. Mit einer Prozessdauer von 96 h entspricht diese Konzentration einer Raum-Zeit-Ausbeute für D-Galacturonsäure von 0,060 g L⁻¹ h⁻¹. Insgesamt wurden 26 g L⁻¹ Zuckermonomere freigesetzt. Durch eine Temperaturerhöhung auf 50 °C konnte die D-Galacturonsäurefreisetzung auf 7,00 ± 0,09 g L⁻¹ (64 % Ausbeute) erhöht werden (Abb. 6.1.1). Für das gewünschte Produkt D-Galacturonsäure konnte so während der Hydrolyse die vorerst höchste Raum-Zeit-Ausbeute von 0,073 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht werden. Final wurden bei 50 °C nach 96 h 32 g L⁻¹ Zuckermonomere freigesetzt.

Da die Hydrolyse im angestrebten integrierten Verfahren gekoppelt mit der Polygalacturonaseproduktion ablaufen soll, wurde im Anschluss das Kultivierungsmedium mit pH Regelung verwendet. Unter definierten Bedingungen bei pH 4,5 und 50 °C konnten mit 500 U g_{Substrat}⁻¹ 11,43 ± 0,30 g L⁻¹ D-Galacturonsäure aus 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzeln (70,6 ± 1,8 % D-Galacturonsäureausbeute) freigesetzt werden. Nach 67 h konnte somit eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,17 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht werden. Insgesamt wurden mit 500 U g⁻¹_{Substrat} 46 g L⁻¹ Zuckermonomere freigesetzt, was einer Gesamtausbeute von ~ 76 % entspricht.

Zur Realisierung der gekoppelten Polygalacturonaseproduktion und enzymatischen Hydrolyse im Satzverfahren wurden Voruntersuchungen im Hinblick auf die Mischzeiten, Skalierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Enzymherstellung im 7,5 L Maßstab durchgeführt, die anschließend final in einem Prozess zusammengeführt wurden (Abb. 6.1.1).

Bei der angewendeten Prozessstrategie wurde nach Abschluss der etablierten Enzymherstellung mit 30 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzeln eine Feststoffzugabe steriler Zuckerrübenschnitzel (75 g L^{-1}) durchgeführt. Mit den $10,71 \text{ g L}^{-1}$ D-Galacturonsäure, welche innerhalb von 71 h freigesetzt wurden, konnte so eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und eine Gesamtausbeute von 69 % erreicht werden. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass eine Prozessintegration von Enzymherstellung mit *A. niger* und enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln zur Freisetzung von D-Galacturonsäure in einfacher und effizienter Weise erfolgen kann.

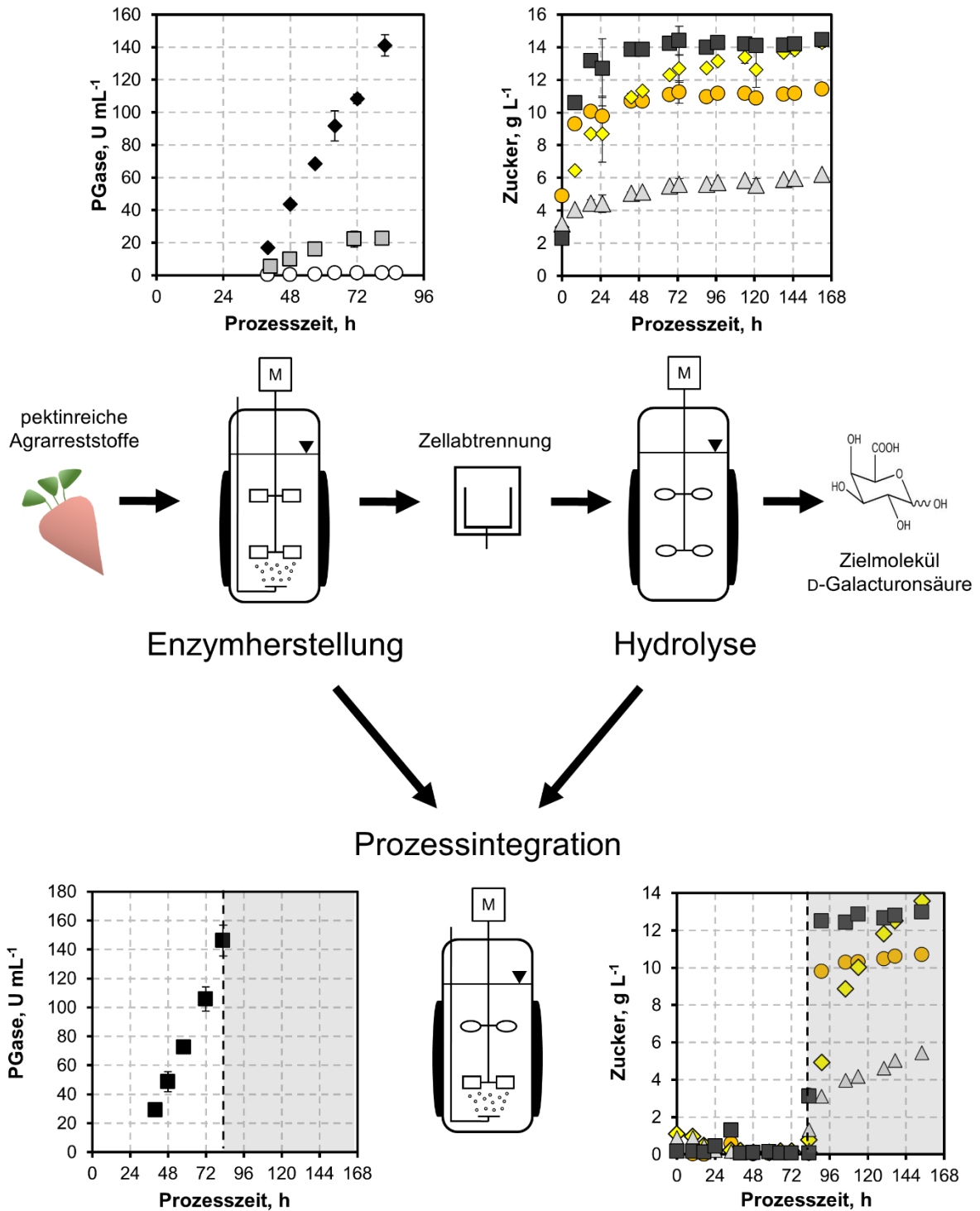


Abb. 6.1.1: Polygalacturonaseaktivität und Zuckerkonzentrationen im Kulturüberstand während Kultivierungen von *A. niger*, Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln und Prozessintegration beider Prozessschritte. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Polygalacturonaseaktivität (PGase) während der Enzymherstellung mit *A. niger* (oben links - Wildtyp ATCC 11414 (o), Wildtyp ATCC 11414 nach reaktionstechnischer Charakterisierung (□) und rekombinanter aKS055 (◆). Oben rechts dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Zuckerkonzentrationen D-Galacturonsäure (●, orange), D-Glucose (◆, gelb), D-Xylose-Mannose-Galactose-Fruktose (△, hellgrau) und L-Arabinose (■, dunkelgrau) während der Hydrolyse von 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel mit dem hergestellten Enzymgemisch. Unten dargestellt ist die Prozessintegration der Kultivierung des rekombinanten *A. niger* aKS055 mit angeschlossener enzymatischer Hydrolyse von 75 g L⁻¹ Zuckerrübenschnitzel (Polygalacturonaseaktivität (links) und der Zuckerkonzentrationen (rechts, Legende siehe oben).

Ausblick

In Bezug auf die stoffliche Umwandlung der D-Galacturonsäure wäre es sinnvoll, einen rekombinanten *A. niger* Stamm zu erzeugen, der nicht befähigt ist, D-Galacturonsäure zu verstoffwechseln. So könnte eine gekoppelte Produktion pektinolytischer Enzyme und Hydrolyse der Zuckerrübenschnitzel in einem Rührkesselreaktor ohne Inaktivierungsschritt von *A. niger* durchgeführt werden. Durch die Verstoffwechslung der anderen freigesetzten Zuckermonomere (Glucose, Xylose, Mannose, Galactose und Arabinose) stünden genügend Kohlenstoffquellen für das Wachstum von *A. niger* zur Verfügung. Für diesen Ansatz müsste jedoch auch der negative Einfluss einer erhöhten Zuckerrübenschnitzelkonzentration auf die Polygalacturonaseproduktion von *A. niger* untersucht und behoben werden.

Weiterhin wäre es sinnvoll, geeignete Biotransformationen der freigesetzten Zuckermonomere, insbesondere D-Galacturonsäure, direkt im Hydrolysat zu untersuchen, um durch flexible Anpassung dieser Biotransformation eine Vielzahl an unterschiedlichen Produkten effizient herstellen zu können.

7. Literatur

- Abdel-Rahim AM, Arbab HA. 1985:** Nutrient requirements in germination of conidiospores of *Aspergillus niger* V. Tieghen. *Mycopathologia* 92(2):111–113.
- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E. 1995:** Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 43(5):808–814.
- Alazi E, Knetsch T, Di Falco M, Reid ID, Arentshorst M, Visser J, Tsang A, Ram AFJ. 2018:** Inducer-independent production of pectinases in *Aspergillus niger* by overexpression of the D-galacturonic acid-responsive transcription factor *gaaR*. *Applied microbiology and biotechnology* 102(6):2723–2736.
- Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ, van de Vondervoort PJI, Culley D, Thykaer J, Frisvad JC, Nielsen KF, Albang R, Albermann K, Berka RM, Braus GH, Braus-Stromeyer SA, Corrochano LM, Dai Z, van Dijck PWM, Hofmann G, Lasure LL, Magnuson JK, Menke H, Meijer M, Meijer SL, Nielsen JB, Nielsen ML, van Ooyen AJJ, Pel HJ, Poulsen L, Samson RA, Stam H, Tsang A, van den Brink JM, Atkins A, Aerts A, Shapiro H, Pangilinan J, Salamov A, Lou Y, Lindquist E, Lucas S, Grimwood J, Grigoriev IV, Kubicek CP, Martinez D, van Peij NNME, Roubos JA, Nielsen J, Baker SE. 2011:** Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome research* 21(6):885–897.
- Antecka A, Bizukojc M, Ledakowicz S. 2016:** Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 32(12):193.
- Ask M, Olofsson K, Di Felice T, Ruohonen L, Penttilä M, Lidén G, Olsson L. 2012:** Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry* 47(10):1452–1459.
- Baciu I-E, Jördening H-J. 2004:** Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 34(5):505–512.
- Barrios-Gonzalez J, Martnez C, Aguilera A, Raimbault M. 1989:** Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters* 11(8):551–554.
- Battaglia E, Visser L, Nijssen A, van Veluw GJ, Wösten HAB, Vries RP de. 2011:** Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in Eurotiales. *Studies in mycology* 69(1):31–38.

- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. 2006:** Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(30):11417–11422.
- Bawn M, Subrizi F, Lye GJ, Sheppard TD, Hailes HC, Ward JM. 2018:** One-pot, two-step transaminase and transketolase synthesis of l-gluco-heptulose from l-arabinose. *Enzyme and Microbial Technology* 116:16–22.
- Bélafi-Bakó K, Eszterle M, Kiss K, Nemestóthy N, Gubicza L. 2007:** Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering* 78(2):438–442.
- Bellido C, Infante C, Coca M, González-Benito G, Lucas S, García-Cubero MT. 2015:** Efficient acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresource technology* 190:332–338.
- Benoit I, Coutinho PM, Schols HA, Gerlach JP, Henrissat B, Vries RP de. 2012:** Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC genomics* 13:321.
- Benz JP, Chau BH, Zheng D, Bauer S, Glass NL, Somerville CR. 2014a:** A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Molecular microbiology* 91(2):275–299.
- Benz JP, Protzko RJ, Andrich JM, Bauer S, Dueber JE, Somerville CR. 2014b:** Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. *Biotechnology for biofuels* 7(1):20.
- Berenjian A (editor). **2019:** *Essentials in Fermentation Technology*. Cham: Springer International Publishing.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. 2018:** *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Berlowska J, Binczarski M, Dudkiewicz M, Kalinowska H, Witonska IA, Stanishevsky AV. 2015:** A low-cost method for obtaining high-value bio-based propylene glycol from sugar beet pulp. *RSC Adv.* 5(3):2299–2304.

- Berlowska J, Binczarski M, Dziugan P, Wilkowska A, Kregiel D, Witonska I. 2018a:** Sugar Beet Pulp as a Source of Valuable Biotechnological Products. In: *Advances in Biotechnology for Food Industry*: Elsevier. p 359–392.
- Berlowska J, Cieciora-Włoch W, Kalinowska H, Kregiel D, Borowski S, Pawlikowska E, Binczarski M, Witonska I. 2018b:** Enzymatic Conversion of Sugar Beet Pulp: A Comparison of Simultaneous Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation for Lactic Acid Production. *Food technology and biotechnology* 56(2):188–196.
- Bizukojc M, Ledakowicz S. 2010:** The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World J Microbiol Biotechnol* 26(1):41–54.
- Bonnin E, Ralet M-C, Thibault J-F, Schols HA. 2009:** Enzymes for the valorisation of fruit- and vegetable-based co-products. In: *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing*: Elsevier. p 257–285.
- Brown NA, Ries LNA, Goldman GH. 2014:** How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. *Fungal genetics and biology : FG & B* 72:48–63.
- Buchholt HC, Christensen TMIE, Fallesen B, Ralet M-C, Thibault J-F. 2004:** Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. *Carbohydrate Polymers* 58(2):149–161.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung. **2021:** Bioökonomie als gesellschaftlicher Wandel. https://www.bmbf.de/SharedDocs/Publikationen/de/bmbf/7/24072_Biooekonomie_als_gesellschaftlicher_Wandel.pdf;jsessionid=697CDCD4E86CA4D195551B402FEBFC36.live382?__blob=publicationFile&v=3.
- Bustamante MCC, Cerri MO, Badino AC. 2013:** Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. *Chemical Engineering Science* 90(2):92–100.
- Caffall KH, Mohnen D. 2009:** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research* 344(14):1879–1900.
- Cairns TC, Nai C, Meyer V. 2018:** How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal biology and biotechnology* 5:13.
- Campbell WH, Kinghorn JR. 1990:** Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends in Biochemical Sciences* 15(8):315–319.

- Carpita NC, McCann MC. 2002:** The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. *Plant and Soil* 247(1):71–80.
- Chitarra GS, Abee T, Rombouts FM, Posthumus MA, Dijksterhuis J. 2004:** Germination of penicillium paneum Conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and environmental microbiology* 70(5):2823–2829.
- Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D. 2018:** Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chmiel H, Walitza E. 2018:** Transportvorgänge in Biosuspensionen. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 131–156.
- Chmiel H, Weuster-Botz D. 2018:** Bioreaktoren. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 157–229.
- Choi J-M, Han S-S, Kim H-S. 2015:** Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances* 33(7):1443–1454.
- Concha Olmos J, Zúñiga Hansen ME. 2012:** Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates. *Chemical Engineering Journal* 192:29–36.
- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA. 2001:** The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal genetics and biology : FG & B* 33(3):155–171.
- Conesa A, van den Hondel CA, Punt PJ. 2000:** Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology* 66(7):3016–3023.
- Corrêa LJ, Badino AC, Cruz AJG. 2016:** Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. *Bioprocess and biosystems engineering* 39(2):285–294.
- Cosgrove DJ. 2005:** Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(11):850–861.
- Cove DJ. 1979:** Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 54(3):291–327.
- Devos RJB, Colla LM. 2022:** Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: A bibliometric and systematic study. *Bioresource Technology Reports* 17(4):100924.

- Ding S-Y, Himmel ME. 2006:** The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(3):597–606.
- Driouch H, Sommer B, Wittmann C. 2010:** Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and bioengineering* 105(6):1058–1068.
- Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N. 2022:** The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic acids research* 50(D1):D571-D577.
- Dynesen J, Nielsen J. 2003:** Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnology progress* 19(3):1049–1052.
- El Enshasy HA, Elsayed EA, Suhaimi N, Malek RA, Esawy M. 2018:** Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC biotechnology* 18(1):71.
- El-Enshasy H, Hellmuth K, Rinas U. 1999:** Fungal Morphology in Submerged Cultures and Its Relation to Glucose Oxidase Excretion by Recombinant *Aspergillus niger*. *ABAB* 81(1):1–12.
- El-Enshasy H, Kleine J, Rinas U. 2006:** Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 41(10):2103–2112.
- Elst K, Babbar N, van Roy S, Baldassarre S, Dejonghe W, Maesen M, Sforza S. 2018:** Continuous production of pectic oligosaccharides from sugar beet pulp in a cross flow continuous enzyme membrane reactor. *Bioprocess and biosystems engineering* 41(11):1717–1729.
- Fiedler MRM, Barthel L, Kubisch C, Nai C, Meyer V. 2018:** Construction of an improved *Aspergillus niger* platform for enhanced glucoamylase secretion. *Microbial cell factories* 17(1):95.
- Finkenstadt VL. 2014:** A Review on the Complete Utilization of the Sugarbeet. *Sugar Tech* 16(4):339–346.
- Friedrich J, Cimerman A, Steiner W. 1990:** Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II-trihydrate. *Applied microbiology and biotechnology* 33(4).
- Fritsche O, Lay M. 2016:** *Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Fuchs G. 2007:** *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

- Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. 2016:** Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6(1):47.
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. 2007:** The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in mycology* 59:1–10.
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S. 2013:** Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual review of microbiology* 67:477–498.
- Grimm LH, Kelly S, Hengstler J, Göbel A, Krull R, Hempel DC. 2004:** Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnology and bioengineering* 87(2):213–218.
- Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC. 2005a:** Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 69(4):375–384.
- Grimm LH, Kelly S, Völkerding II, Krull R, Hempel DC. 2005b:** Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnology and bioengineering* 92(7):879–888.
- Gullón B, Gullón P, Sanz Y, Alonso JL, Parajó JC. 2011:** Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology* 44(8):1687–1696.
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. 2010:** Biosynthesis of pectin. *Plant physiology* 153(2):384–395.
- Harris PJ, Stone BA. 2008:** Chemistry and Molecular Organization of Plant Cell Walls. In: Himmel ME, editor. *Biomass Recalcitrance*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p 61–93.
- Hasper AA, Trindade LM, van der Veen D, van Ooyen AJJ, Graaff LH de. 2004:** Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology (Reading, England)* 150(Pt 5):1367–1375.
- Hayer K, Stratford M, Archer DB. 2014:** Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to L-amino acids. *Applied and environmental microbiology* 80(19):6046–6053.
- Hobot JA, Gull K. 1980:** The identification of a self-inhibitor from *Syncephalastrum racemosum* and its effect upon sporangiospore germination. *Antonie van Leeuwenhoek* 46(5):435–441.
- Hogan DA. 2006:** Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic cell* 5(4):613–619.

- Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S. 2020:** Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. *Biomass and Bioenergy* 134(20):105481.
- Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC. 2004:** Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering* 26(5):315–323.
- Ketipally R, Ram MR. 2018:** Optimization of Pectinase Production by *Aspergillus Oryzae* RR 103. *Curr Agri Res Jour* 6(1):37–44.
- Kiep KA. 2011:** Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von *Aspergillus niger*. Göttingen: Cuvillier-Verlag.
- Kis-Papo T, Oren A, Wasser SP, Nevo E. 2003:** Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microbial ecology* 45(2):183–190.
- Kohn R, Kovac P. 1978:** Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives. *Chem. Zvesti* 32:478–485.
- Kowalczyk JE, Benoit I, Vries RP de. 2014:** Chapter Two - Regulation of Plant Biomass Utilization in *Aspergillus*. In: Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press. p 31–56.
- Kracher D, Oros D, Yao W, Preims M, Rezić I, Haltrich D, Rezić T, Ludwig R. 2014:** Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnology journal* 9(4):483–492.
- Kraume M. 2002:** Homogenisieren in Rührbehältern. In: Kraume M, editor. *Mischen und Rühren*: Wiley. p 21–44.
- Kraume M. 2012:** Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Krog-Mikkelsen I, Hels O, Tetens I, Holst JJ, Andersen JR, Bukhave K. 2011:** The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies in vitro and in humans. *The American journal of clinical nutrition* 94(2):472–478.
- Krohn NG, Brown NA, Colabardini AC, Reis T, Savoldi M, Dinamarco TM, Goldman MHS, Goldman GH. 2014:** The *Aspergillus nidulans* ATM kinase regulates mitochondrial function, glucose uptake and the carbon starvation response. *G3 (Bethesda, Md.)* 4(1):49–62.
- Krull R, Cordes C, Horn H, Kampen I, Kwade A, Neu TR, Nörtemann B. 2010:** Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 121:1–21.

- Kück U, Nowrousian M, Hoff B, Engh. I. 2009:** Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. s.l.: Springer-Verlag. 214 p.
- Kühnel S. 2011:** Characterization of cell wall degrading enzymes from *Chrysosporium lucknowense* C1 and their use to degrade sugar beet pulp. PhD thesis.
- Kühnel S, Schols HA, Gruppen H. 2011:** Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for biofuels* 4:14.
- Kuivanen J, Mojzita D, Wang Y, Hilditch S, Penttilä M, Richard P, Wiebe MG. 2012:** Engineering filamentous fungi for conversion of D-galacturonic acid to L-galactonic acid. *Applied and environmental microbiology* 78(24):8676–8683.
- Kuivanen J, Penttilä M, Richard P. 2015:** Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial cell factories* 14:2.
- Kurt T, Marbà-Ardébol A-M, Turan Z, Neubauer P, Junne S, Meyer V. 2018:** Rocking *Aspergillus*: morphology-controlled cultivation of *Aspergillus niger* in a wave-mixed bioreactor for the production of secondary metabolites. *Microbial cell factories* 17(1):128.
- Leijdekkers AGM, Bink JPM, Geutjes S, Schols HA, Gruppen H. 2013:** Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. *Bioresource technology* 128:518–525.
- Leitner J, Hinterstoisser B, Wastyn M, Keckes J, Gindl W. 2007:** Sugar beet cellulose nanofibril-reinforced composites. *Cellulose* 14(5):419–425.
- Li F, Foucat L, Bonnin E. 2021:** Effect of solid loading on the behaviour of pectin-degrading enzymes. *Biotechnology for biofuels* 14(1):107.
- Li G, Zhang Y, Zhao C, Xue H, Yuan L. 2020:** Chemical variation in cell wall of sugar beet pulp caused by aqueous ammonia pretreatment influence enzymatic digestibility of cellulose. *Industrial Crops and Products* 155(7):112786.
- Li M, Wang L-j, Li D, Cheng Y-I, Adhikari B. 2014:** Preparation and characterization of cellulose nanofibers from de-pectinated sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 102:136–143.
- Lin X, Alspaugh JA, Liu H, Harris S. 2014:** Fungal morphogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5(2):a019679.

- Lu F, Ping K, Wen L, Zhao W, Wang Z, Chu J, Zhuang Y. 2015:** Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process Biochemistry* 50(9):1342–1348.
- Lubertozzi D, Keasling JD. 2009:** Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology advances* 27(1):53–75.
- Magnuson JK, Lasure LL. 2004:** Organic Acid Production by Filamentous Fungi. In: Tkacz JS, Lange L, editors. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Boston, MA: Springer US. p 307–340.
- Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, van Rossen-Uffink D, Peng M, Vries RP de. 2018:** The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Scientific reports* 8(1):6655.
- Martens-Uzunova ES, Schaap PJ. 2009:** Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal genetics and biology : FG & B* 46 Suppl 1:S170-S179.
- Marzluf GA. 1993:** Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annual review of microbiology* 47:31–55.
- Marzo C, Díaz AB, Caro I, Blandino A. 2021:** Valorisation of fungal hydrolysates of exhausted sugar beet pulp for lactic acid production. *J. Sci. Food Agric.* 101(10):4108–4117.
- McIntyre M, Müller C, Dynesen J, Nielsen J. 2001:** Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 73:103–128.
- Metz B, Kossen NWF. 1977:** The growth of molds in the form of pellets-a literature review. *Biotechnol. Bioeng.* 19(6):781–799.
- Meyer H-P, Schmidhalter DR. 2014:** *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Meyer V, Andersen MR, Brakhage AA, Braus GH, Caddick MX, Cairns TC, Vries RP de, Haarmann T, Hansen K, Hertz-Fowler C, Krappmann S, Mortensen UH, Peñalva MA, Ram AFJ, Head RM. 2016:** Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal biology and biotechnology* 3:6.
- Meyer V, Fiedler M, Nitsche B, King R. 2015:** The Cell Factory *Aspergillus* Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 149:91–132.

- Meyer V, Wu B, Ram AFJ. 2011:** *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology letters* 33(3):469–476.
- Micard V, Renard CMGC, Thibault J-F. 1994:** Studies on Enzymic Release of Ferulic Acid from Sugar-Beet Pulp. *LWT - Food Science and Technology* 27(1):59–66.
- Micard V, Renard CMGC, Thibault J-F. 1996:** Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 19(3):162–170.
- Mohnen D. 2008:** Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology* 11(3):266–277.
- Mojzita D, Wiebe M, Hilditch S, Boer H, Penttilä M, Richard P. 2010:** Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-galactarate. *Applied and environmental microbiology* 76(1):169–175.
- Nair SR, Rakshit SK, Panda T. 1995:** Effect of carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergilli*. *Bioprocess Engineering* 13(1):37–40.
- Nielsen J. 1993:** A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnology and bioengineering* 41(7):715–727.
- Nitsche BM, Jørgensen TR, Akeroyd M, Meyer V, Ram AFJ. 2012:** The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. *BMC genomics* 13:380.
- Niu J, Alazi E, Reid ID, Arentshorst M, Punt PJ, Visser J, Tsang A, Ram AFJ. 2017:** An Evolutionarily Conserved Transcriptional Activator-Repressor Module Controls Expression of Genes for D-Galacturonic Acid Utilization in *Aspergillus niger*. *Genetics* 205(1):169–183.
- Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. 2008:** A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels* 1(1):7.
- Padder SA, Prasad R, Shah AH. 2018:** Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological research* 210:51–58.
- Panda T, Naidu GSN, Sinha J. 1999:** Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. *Process Biochemistry* 35(1-2):187–195.
- Pandey A, Bhaskar T, Stöcker M, Sukumaran RK. 2015:** Recent advances in thermochemical conversion of biomass. Amsterdam: Elsevier.

- Papagianni M. 2004:** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances* 22(3):189–259.
- Papagianni M, Mattey M, Kristiansen B. 1998:** Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 2(3):197–205.
- Patyshakuliyeva A, Arentshorst M, Allijn IE, Ram AFJ, Vries RP de, Gelber IB. 2016:** Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution. *Biotechnology letters* 38(6):969–974.
- Pazouki M, Panda T. 2000:** Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess Engineering* 22(2):127–143.
- Pel HJ, de WJH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de VRP, Albang R, Albermann K, Andersen, Bendtsen JD, Benen JA, van dBM, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van DPW, van DA, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de GPW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van dHJ, van dHC, van dHR, van dKR, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van KPA, Lauber J, Lu X, van dMM, Meulenber R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van PNN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van dVP, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van OAJ, Visser J, Stam H. 2007:** Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology* 25(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17259976/>.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, La Rubia T de, Martínez J. 2002:** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 5(2):53–63.
- Pili J, Danielli A, Zeni J, Trentini MMS, Cansian RL, Toniazzo G, Valduga E. 2015:** Utilization of Orange Peel, Corn Steep Liquor, and Parboiled Rice Water in the Production of Polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Industrial Biotechnology* 11(5):284–291.
- Posch AE, Herwig C, Spadiut O. 2013:** Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in biotechnology* 31(1):37–44.
- Ptak M, Skowrońska A, Pińkowska H, Krzywonos M. 2022:** Sugar Beet Pulp in the Context of Developing the Concept of Circular Bioeconomy. *Energies* 15(1):175.

- Punt PJ, Schuren FHJ, Lehmebeck J, Christensen T, Hjort C, van den Hondel CAMJJ. 2008:** Characterization of the *Aspergillus niger* prtT, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. *Fungal genetics and biology : FG & B* 45(12):1591–1599.
- Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. 2005:** Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry* 40(1):195–201.
- Ralet M-C, Guillon F, Renard C, Thibault J-F. 2009:** Sugar Beet Fiber. In: Cho S, Samuel P, editors. *Fiber Ingredients*: CRC Press. p 265.
- Read ND. 1991:** Low-Temperature Scanning Electron Microscopy of Fungi and Fungus-Plant Interactions. In: Mendgen K, Lesemann D-E, editors. *Electron Microscopy of Plant Pathogens*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 17–29.
- Reginatto C, Rossi C, Miglioranza BG, Santos Md, Meneghel L, Silveira MMd, Malvessi E. 2017:** Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochemistry* 58:1–8.
- Renard CMGC, Crépeau M-J, Thibault J-F. 1995:** Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydrate research* 275(1):155–165.
- Renneberg R, Süßbier D, Berkling V. 2012:** *Biotechnologie für Einsteiger*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Richard P, Hilditch S. 2009:** D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied microbiology and biotechnology* 82(4):597–604.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001:** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6):929–967.
- Riedlberger P, Brüning S, Weuster-Botz D. 2013:** Characterization of stirrers for screening studies of enzymatic biomass hydrolyses on a milliliter scale. *Bioprocess and biosystems engineering* 36(7):927–935.
- Riedlberger P, Weuster-Botz D. 2012:** New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource technology* 106:138–146.
- Rodríguez-León JA, Carvalho JC de, Pandey A, Soccol CR, Rodríguez-Fernández DE. 2018:** Kinetics of the Solid-State Fermentation Process. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier. p 57–82.

- Rouau X, Bertin C, Thibault J-F. 1987:** Characterization and enzymic degradation of sugar beet fibres. *Food Hydrocolloids* 1(5-6):439–443.
- Rubio MC, Navarro AR. 2006:** Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4):601–606.
- Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R. 2013:** *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 310 p.
- Sandri IG, Lorenzoni CMT, Fontana RC, da Silveira MM. 2013:** Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Science and Technology* 51(2):469–475.
- Sasaki C, Kushiki Y, Asada C, Nakamura Y. 2014:** Acetone–butanol–ethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods using acorns and wood chips of *Quercus acutissima* as a carbon source. *Industrial Crops and Products* 62:286–292.
- Scazzocchio C. 2019:** *Aspergillus: A Multifaceted Genus*. In: Reference Module in Life Sciences: Elsevier. p 669.
- Schmidt O, Angermann H, Frommhold-Treu I, Hoppe K. 1995:** Experimental and theoretical investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology* 43(3):424–430.
- Schmitz K, Protzko R, Zhang L, Benz JP. 2019:** Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* 103(6):2507–2524.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM. 2002:** On the safety of *Aspergillus niger*--a review. *Applied microbiology and biotechnology* 59(4-5):426–435.
- Semenova MV, Rozhkova AM, Osipov DO, Satrutdinov AD, Sinitsyna OA, Rubtsova EA, Kondrateva EG, Sinitsyn AP. 2019:** Selection of the Optimal Enzyme Composition for Sugar Beet Pulp Conversion. *Appl Biochem Microbiol* 55(6):677–683.
- Silva IR, Jers C, Meyer AS, Mikkelsen JD. 2016:** Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New biotechnology* 33(1):41–54.
- Singh SA, Appu Rao AG. 2002:** A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and applied biochemistry* 35(2):115–123.
- Somerville C. 2006:** Cellulose synthesis in higher plants. *Annual review of cell and developmental biology* 22:53–78.

- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H. 2004:** Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* (New York, N.Y.) 306(5705):2206–2211.
- Spagnuolo M, Crecchio C, Pizzigallo MDR, Ruggiero P. 1997:** Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. *Bioresource technology* 60(3):215–222.
- Südzucker AG: Zucker-Lebensenergie aus der Natur von Gewinnung bis zum Eendprodukt. <https://mein-suedzucker.de/susis-welt/downloads?download=S%C3%BCdzucker%20-%20Brosch%C3%BCre%20Zuckergewinnung.pdf> (accessed 23 December 2021).
- Sun R, Hughes S. 1998a:** Extraction and Physico-Chemical Characterization of Pectins from Sugar Beet Pulp. *Polym J* 30(8):671–677.
- Sun R, Hughes S. 1998b:** Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 36(4):293–299.
- Takors R, Weuster-Botz D. 2018:** Prozessmodelle. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 71–105.
- Tanaka H, Wang P-L, Yamada Late O, Tamura T. 1966:** Yellow Pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori*. *Agricultural and Biological Chemistry* 30(2):107–113.
- Turquoise T, Rinaudo M, Taravel FR, Heyraud A. 1999:** Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids* 13(3):255–262.
- Vakil JR, Rao MR, Bhattacharyya PK. 1961:** Effect of CO₂ on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger*. *Archiv fur Mikrobiologie* 39:53–57.
- van Munster JM, Daly P, Delmas S, Pullan ST, Blythe MJ, Malla S, Kokolski M, Noltorp ECM, Wennberg K, Fetherston R, Beniston R, Yu X, Dupree P, Archer DB. 2014:** The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 72:34–47.
- Vats P, Sahoo DK, Banerjee UC. 2004:** Production of phytase (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase) by *Aspergillus niger* van Teighem in laboratory-scale fermenter. *Biotechnology progress* 20(3):737–743.
- Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C. 2018:** The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Applied microbiology and biotechnology* 102(7):2997–3006.

- Vidal S, Doco T, Williams P, Pellerin P, York WS, O'Neill MA, Glushka J, Darvill AG, Albersheim P. 2000:** Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate research* 326(4):277–294.
- Vishniac W, Santer M. 1957:** The Thiobacilli. *Bacteriological reviews* 21(3):195–213.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW, Beck-Sickinger A, Hahn U. 2010:** *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley VCH.
- Vries RP de, Visser J. 2001:** Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 65(4):497-522, table of contents.
- Walisko R, Krull R, Schrader J, Wittmann C. 2012:** Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. *Biotechnology letters* 34(11):1975–1982.
- Watanabe S, Saimura M, Makino K. 2008:** Eukaryotic and bacterial gene clusters related to an alternative pathway of nonphosphorylated L-rhamnose metabolism. *The Journal of biological chemistry* 283(29):20372–20382.
- Weuster-Botz D, Takors R. 2018:** Wachstumskinetik. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 45–70.
- Whitman WG. 1923:** The two-film theory of gas absorption. *Chem. Metall. Eng.* 29:146–148.
- Whitman WG, Lewis WK. 1924:** Principles of gas absorption. *Ind. Eng. Chem* 16:1215.
- Wiebe MG, Mojzita D, Hilditch S, Ruohonen L, Penttilä M. 2010:** Bioconversion of D-galacturonate to keto-deoxy-L-galactonate (3-deoxy-L-threo-hex-2-ulosonate) using filamentous fungi. *BMC biotechnology* 10:63.
- Wong D. 2008:** Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *The protein journal* 27(1):30–42.
- Wucherpfennig T, Kiep KA, Driouch H, Wittmann C, Krull R. 2010:** Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. In: Elsevier. p 89–136.
- Wucherpfennig T, Lakowitz A, Driouch H, Krull R, Wittmann C. 2012:** Customization of *Aspergillus niger* morphology through addition of talc micro particles. *Journal of visualized experiments* : JoVE(61).

- WVZ e.V. & VdZ e.V. **2021**: Jahresbericht 2020 | 2021 der Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. & Verein der Zuckerindustrie e.V. https://www.zuckerverbaende.de/wp-content/uploads/2021/06/WVZ_VdZ_Jahresbericht_2020-2021.pdf.
- Xu J, Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. 2000**: Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. *Biotechnology progress* 16(2):222–227.
- Zamil MS, Geitmann A. 2017**: The middle lamella-more than a glue. *Physical biology* 14(1):15004.
- Zheng Y, Cheng Y-S, Yu C, Zhang R, Jenkins BM, VanderGheynst JS. 2012a**: Improving the efficiency of enzyme utilization for sugar beet pulp hydrolysis. *Bioprocess and biosystems engineering* 35(9):1531–1539.
- Zheng Y, Lee C, Yu C, Cheng Y-S, Zhang R, Jenkins BM, VanderGheynst JS. 2013**: Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy* 105(93):1–7.
- Zheng Y, Yu C, Cheng Y-S, Lee C, Simmons CW, Dooley TM, Zhang R, Jenkins BM, VanderGheynst JS. 2012b**: Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Applied Energy* 93:168–175.
- Zicari S, Zhang R, Kaffka S. 2019**: Sugar Beet. In: *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*: Elsevier. p 331–351.
- Zlokarnik M. 2013**: *Rührtechnik: Theorie und Praxis*: Springer-Verlag.

8. Abkürzungen

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ara	L-Arabinose
BSA	Bovines Serumalbumin
CER	Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (engl. carbon dioxide evolution rate), mol L ⁻¹ h ⁻¹
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
c _s	Substratkonzentration, g L ⁻¹
D-GalA, GalA	D-Galacturonsäure (engl. D-Galacturonic acid)
F	Volumenstrom, L h ⁻¹ oder L min ⁻¹
g	Gramm
GalA	D-Galacturonsäure
Glc	D-Glucose
GRAS	Generally Reconized As Safe, allgemein als sicher anerkannt – Zulassungsbezeichnung Food and Drug Administration (FDA)
h	Stunde (engl. hour)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
mL	Milliliter
mol	Stoffmenge, 1 Mol entspricht 6,02 x 10 ²³ Teilchen
n	Rührerdrehzahl, min ⁻¹
nm	Nanometer
OUR	Sauerstoffaufnahme (engl. oxygen uptake rate), mol L ⁻¹ h ⁻¹
RG	Rhamnogalacturonan
t	Tonnen
T	Temperatur, °C
U	Enzymeinheit (Unit), 1 U entspricht 1,67 x 10 ⁻⁸ kat
V	Volumen, L
vvm	Reaktorvolumen pro Minute (engl. vessel volume per minute)
XMGF	D-Xylose, D-Mannose, D-Galactose, D-Fructose

9. Anhang

9.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Geräte

Tabelle 9.1.1: Zusammenstellung der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller oder Lieferant
Autoklav	VX 150, V 150	Systemec GmbH, Wetzlar, Deutschland
Autoklav	Varioklav EC Zyklondampf	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Analysenwaage	Explorer E1M213, E12145	Ohaus Waagen Vertriebs GmbH, Gießen, Deutschland
Analysenwaage	SARTORIUS ENTRIS6202i-1S	Sartorius AG, Göttingen, Germany
Inkubator	Multitron AJ119	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Inkubator	WIS-20R	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland
Inkubator	KB 53 E3.1	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator	Bode Mini-Brutschrank	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	D-6010	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	Variomag	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Magnetrührer	Topolino 10.020157	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop (Software)	Axioplan (ZEN Blue edition)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Kamera	Axiocam ICc3	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Objektiv	EC Plan Neofluar 2,5x/10x/40x	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer	Infinite M200 Pro	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
pH Meter	BlueLine pH14 & Lab 850	Schott AG, Mainz, Deutschland

Pumpe	Ismatec® BVP Standard, Master® II Easy-Load® L/S™	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Rheometer	Rheolab QC	Anton Paar Germany GmbH, Graz, Österreich
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Sterilwerkbank	HERA SAFE KS 12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sterilwerkbank	SWB Klasse 1 FAZ 3	WALDNER Holding SE & Co. KG, Wangen, Deutschland
Thermoblock	VWR Standard Block He- ater	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutsch- land
Thermoschüttler	Shaker DTS-2	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thermoschüttler	Thermo Shaker TS-100	BioSan SIA, Riga, Litauen
Thermoschüttler	ThermoMixer® C	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Vakuum Pumpe	N840.3FT.40.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vortexer	Sunlab SU1900	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	mgw Lauda MT	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad	W15	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9.1.2: Komponenten der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktorblock	bioREACTOR 48	2mag AG, München, Deutschland
Steuergerät	MIXcontrol	2mag AG, München, Deutschland
Einwegreaktor	HTBD	2mag AG, München, Deutschland
Umwälzthermostat	ME12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Kühlaggregat	Minichiller 600	Peter Huber Kältemaschinenbau AG, Offenburg, Deutschland

Tabelle 9.1.3: Komponenten der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktor	DASGIP® Parallel Bio-reactor System	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Gasmischmodul	DASGIP® MX4/4	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pumpenmodul	DASGIP® MP8	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
pH & DO Überwachungsmodul	DASGIP® PHPO	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Temperatur & Rührer Überwachungsmodul	DASGIP® TC4SC4	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Sauerstoffsonde	VisiFerm DO EXS 225 H0	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pH Sonde	EasyFerm Plus PHI K8 225	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Abgasanalytik	BlueVary	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Software	DASware® control	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9.1.4: Komponenten des Rührkesselreaktors im Liter-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktor	Labfors 5	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sauerstoffsonde	VisiFerm DO Arc 425	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pH Sonde	EasyFerm Plus Arc 425	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Abgasanalytik	BlueVary	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Software	EVE	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Chemikalien

Tabelle 9.1.5: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
4-Hydroxybenzhydrazide	H9882-25G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Albumin Standard	23209	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ammoniumdihydrogenphosphat	P727.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	LC-7318.1	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	3666.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	3746.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Arabinan	130801a	Megazyme Ltd., Wicklow, Irland
Calciumchlorid Dihydrat	5239.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Carboxymethylcellulose Natriumsalz	C5678-500G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	LC-8646.1	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	23236	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	P749.3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
D(-)-Fructose	4981.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

D(+)-Galactose	8878.3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Galacturonsäure Monohydrat	48280-25G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glucose	HN06.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Mannose	4220.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Xylose	5537.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	P015.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	33209-2.5L	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure	X986	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt, mikro-granuliert	2904.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	LC.4508.2	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid	6781.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid Pellets	LC-7900.3	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumsulfat	CN79.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Kartoffelextrakt-Glucose-Agar	X931.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat	7095.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	P024.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
L(+)-Arabinose	5118.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
L(-)-Fucose	KK10.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	3772.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
L(-)-Rhamnose Monohydrat	4655.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	1.414.040.914	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	5304.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat	6779.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	3957.4	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	6771.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

Natriumnitrat	A136.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Pectin C	8911.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Pectinase aus <i>Aspergillus aculeatus</i>	P2611	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polygalacturonsäure	81325-50G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Poly(propylene glycol)	202339-500G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure, 37 %	4625.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, 96 %	4623.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
tri-Natriumcitrat Dihydrat	3580.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Urea	2317.3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Uridin	U3003-50G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Viscozyme	V2010	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zinksulfat-Heptahydrat	1.088.830.500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchmaterial

Tabelle 9.1.6: Zusammenstellung des verwendeten Verbrauchmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
96well PCR-Platte, 0.2 ml	7-5201	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
100 Sterican® 0.8 x 120 mm	466 5643	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
100 Sterican® 0.90 x 70 mm	466 5791	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Acro® 50, Belüftungsfiler, Emflon® II Membran	A50V002P2	Pall Filtersystems GmbH, Crailsheim, Deutschland
Acro® 50, Belüftungsfiler, PTFE Membran	PN4251	Pall Filtersystems GmbH, Crailsheim, Deutschland
BD Discardit™ II Spritze 10 ml	03626823	Becton Dickinson S.A., Fraga (Huesca), Spanien
BD Discardit™ II Spritze 20 ml	300296	Becton Dickinson S.A., Fraga (Huesca), Spanien

BD Discardit™ II Spritze 50 ml	300866	Becton Dickinson S.A., Fraga (Huesca), Spanien
Bördelkappe ND11	70256	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Chromafil® RC-20/15 MS, Spritzenvorsatzfilter	729036	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Deckgläser 18 x 18 mm	H876	R, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HPLC- Mikroeingang, N 9 N 10 N 11	702813	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
HPLC- Rollrandflasche, N 11	702885	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Luer Lock Stopfen	8501532	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Mikrotiterplatte 96 Well	82.1581	Sarstedt AD & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Millipore Express® PLUS 0.22 µm	GPWP04700	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PES Membran, 47 mm		
Millipore Express® PLUS 0.45 µm	HPWP04700	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PES Membran, 47 mm		
Minisart®, Spritzenvorsatzfilter	16534	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Objektträger, Menzel Gläser	656.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Omnifix® F Solo, 1 mL	9161406V	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Petrischalen mit Nocken	633180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten Spitzen, 10 mL	702603	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten Spitzen, 2 - 200 µL	732028	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten Spitzen, 50 – 1000 µL	732032	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Safe-Lock Tube 1.5 mL	0030	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
	120.086	

Safe-Lock Tube 2.0 mL	0030 120.094	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Steritop® PES Membran 0.22µm, 45 mm	S2GPT02RE	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TipOne® 1000 µL XL RPT Fil- terspitze, graduiert	S1122-1730	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutsch- land
TipOne® 200 µL UltraPoint Filterspitze, graduiert	S1120-8810	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutsch- land
TipOne® 20 µL UltraPoint Fil- terspitze, graduiert	S1123-1810	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutsch- land
Ultra-durchsichtige Filme für qPCR	391-1258	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vivaspin, Zentrifugenröhr- chen, MWCO 10 kDa		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Whatman™ Filterpapier, Grad 1, 55 mm	1001-055	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Whatman™ Filterpapier, Grad 5, 55 mm	1005-055	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Whirl-Pak® 125 x 380 mm, steril	1-7283	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Whirl-Pak® 150 x 230 mm, steril	1-7158	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 15 mL, PP, Cellstar®	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land
Zentrifugenröhrchen, 50 mL, PP, Cellstar®	227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land

9.2 Tabellen und Abbildungen

Tabellen

Tabelle 4.1.1: Verwendete <i>A. niger</i> Basisstämme und deren Eigenschaften.....	40
Tabelle 4.1.2: Von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft bereitgestellte, rekombinante <i>A. niger</i> Stämme und deren Eigenschaften.....	41
Tabelle 4.2.1: Zusammensetzung des PDAYET-Mediums zur Vorkulturherstellung.....	42
Tabelle 4.2.2: Zusammensetzung der 1000x Spurenelementlösung nach (Vishniac & Santer 1957).	43
Tabelle 4.2.3: Zusammensetzung der Sporenlösung (NaCl-Tween).	43
Tabelle 4.2.4: Siebanalyse zur Bestimmung der Partikelgröße von Zuckerrübenschnitzeln.	44
Tabelle 4.2.5: Zusammensetzung des halb-definierten Referenzmediums zur Kultivierung von <i>A. niger</i>	45
Tabelle 4.2.6: Zusammensetzung des Komplexmediums zur Kultivierung von <i>A. niger</i>	47
Tabelle 4.2.7: Typ und Konzentration der zum Komplexmedium hinzugefügten Stickstoffquelle.	47
Tabelle 4.2.8: Zusammensetzung des gepufferten Hydrolysemedium im mL-Maßstab.	48
Tabelle 4.3.1: Geometrische Daten der Rührerkonfigurationen.....	56
Tabelle 4.5.1: Zusammensetzung der PAHBAH Reagenzien.....	63
Tabelle 4.5.2: Technische Daten und Betriebsparameter der verwendeten HPLC-Anlage ...	65
Tabelle 5.1.1: Untersuchte Leistungseinträge im 1,5 L-Maßstab.....	74
Tabelle 5.4.1: Zusammensetzung Zuckerrübenschnitzel (%Trockenmasse).	117
Tabelle 5.4.2: Eingesetzte Zuckerkonzentrationen während der Untersuchung der Enzym-Inhibition.	119
Tabelle 5.5.1: Mischzeiten θ_{90} unterschiedlicher Rührerkonfigurationen (Tabelle 4.3.1 und Abb. 4.3.3) im 7,5 L Maßstab bei 600 min^{-1}	133
Tabelle 9.1.1: Zusammenstellung der verwendeten Geräte	166
Tabelle 9.1.2: Komponenten der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab.	168
Tabelle 9.1.3: Komponenten der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab. ...	168

Tabelle 9.1.4: Komponenten des Rührkesselreaktors im Liter-Maßstab.....	169
Tabelle 9.1.5: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien.....	169
Tabelle 9.1.6: Zusammenstellung des verwendeten Verbrauchmaterial.....	171

Abbildungen

Abb. 3.1.1: Morphologische Aufnahmen von <i>Aspergillus niger</i>	7
Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus und der Morphogenese von <i>Aspergillus niger</i>	11
Abb. 3.2.1: Wachstumskurve unter idealen Bedingungen im Rührkesselreaktor aus Weuster-Botz & Takors 2018.	17
Abb. 3.2.2: Schematische Darstellung der Konzentrationsprofile des Zweifilmmodells in der Gas- und der Flüssigphase (nach Kraume 2012).....	20
Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Zellwand.	29
Abb. 3.3.2: Schematische Darstellung der vier Untereinheiten Homogalacturonan, Xylogalacturonan, Rhamnogalacturonan I und II von Pektin und Strukturformel von D-Galacturonsäure.	33
Abb. 3.3.3: Schematische Darstellung der Homogalacturonan abbauenden Enzyme.	36
Abb. 3.3.4: Schematische Darstellung der Rhamnogalacturonan I abbauenden Enzyme. ...	37
Abb. 4.3.1: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 7,5 L-Maßstab.....	53
Abb. 4.3.2: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 1,5 L-Maßstab.....	55
Abb. 4.3.3: Untersuchte Rührerkonfigurationen in 3 L 70 %iger Glycerinlösung.....	57
Abb. 4.4.1: 48fach parallel Rührkesselreaktorblock im mL-Maßstab.	58
Abb. 4.4.2: Anlagenaufbau Zur Hydrolyse pektinreicher Agrarreststoffe im mL-Maßstab.....	59
Abb. 5.1.1: Polygalacturonaseaktivität der <i>A. niger</i> Stämme NRRL3, N402, ATCC 1015, ATCC11414, CBS 513.88 und NRRL 3122 nach 96 h Kultivierung im Schüttelkolben.	68
Abb. 5.1.2: Biotrockenmassekonzentration und Morphologie bei Kultivierungen verschiedener <i>A. niger</i> Wildtyp-Stämme.	70
Abb. 5.1.3: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Kultivierungen verschiedener <i>A. niger</i> Wildtyp-Stämme.	72

Abb. 5.1.4: Biotrockenmassekonzentration (BTM), Morphologie, Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität (PGase) von <i>A. niger</i> ATCC 11414 in Abhängigkeit des Leistungseintrages.....	76
Abb. 5.2.1: Mikroskopische Aufnahmen während der Kultivierung des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit 30 g L ⁻¹ Zuckerrübenschnitzel.....	79
Abb. 5.2.2: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit Substratkonzentrationen von 20-35 g L ⁻¹ Zuckerrübenschnitzel.....	80
Abb. 5.2.3: Prozessdaten der Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit Substratkonzentrationen von 20-35 g L ⁻¹ Zuckerrübenschnitzel.....	82
Abb. 5.2.4: pH Verlauf bei der Kultivierung des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 ohne pH Regelung.....	85
Abb. 5.2.5: Mikroskopische Aufnahmen (48 h) der Kultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH.....	86
Abb. 5.2.6: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH.....	87
Abb. 5.2.7: Prozessdaten der Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem pH.....	89
Abb. 5.2.8: Prozessdaten der Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration.....	92
Abb. 5.2.9: Prozessdaten der Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration.....	94
Abb. 5.2.10: Finale Polygalacturonaseaktivität nach Kultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Stickstoffquelle und molarer Stickstoffkonzentration.....	95
Abb. 5.2.11 Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Inokulationskonzentration.....	98
Abb. 5.2.12: Prozessdaten der Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit variiertem Inokulationskonzentration.....	100
Abb. 5.3.1: Mikroskopische Aufnahmen bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 und des rekombinanten <i>A. niger</i> Stammes aKS039.....	102
Abb. 5.3.2: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 und des rekombinanten <i>A. niger</i> Stammes aKS039.....	103

Abb. 5.3.3: Prozessdaten der Kultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstammes ATCC 11414 und des rekombinanten <i>A. niger</i> Stammes aKS039.	104
Abb. 5.3.4: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen mit den rekombinanten <i>A. niger</i> Stämmen aKS055 bis aKS058.....	107
Abb. 5.3.5: Prozessdaten der Satzkultivierungen mit den rekombinanten <i>A. niger</i> Stämmen aKS055 bis aKS058.....	109
Abb. 5.3.6: Zuckerkonzentrationen bei Satzkultivierungen mit den rekombinanten <i>A. niger</i> Stämmen aKS055 und aKS090.	110
Abb. 5.3.7: Prozessdaten der Satzkultivierungen mit den rekombinanten <i>A. niger</i> Stämmen aKS055 und aKS090.	111
Abb. 5.3.8: Mikroskopische Aufnahmen der rekombinanten <i>A. niger</i> Stämme aKS055 und aKS056.....	112
Abb. 5.3.9: Mikroskopische Aufnahmen des Basisstammes ATCC 11414 und der rekombinanten <i>A. niger</i> Stämme aKS055 bis aKS090.	113
Abb. 5.4.1: Ausbeute und Verlustausgleichsfaktoren der Zuckermonomerstandards bei der Zusammensetzungsanalyse.	117
Abb. 5.4.2: Viskositätsverläufe während der Hydrolyse von Zitruspektin mit der von <i>A. niger</i> hergestellten Enzymmischung.	120
Abb. 5.4.3: pH Verlauf während der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln in Abhängigkeit des eingesetzten Puffers.	121
Abb. 5.4.4: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln in Abhängigkeit des Puffers.	123
Abb. 5.4.5: Zuckerkonzentration während der enzymatischen Langzeithydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln.....	124
Abb. 5.4.6: Einfluss der Temperatur auf die relative Polygalacturonase- und Cellulaseaktivität der mittels <i>A. niger</i> hergestellten Enzymmischung.	125
Abb. 5.4.7: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln bei 30 °C und 50 °C.....	127
Abb. 5.4.8: Zuckerkonzentration und finale Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von 75 g L ⁻¹ Zuckerrübenschnitzeln im Rührkesselreaktor.....	129

Abb. 5.5.1: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Basisstamms ATCC 11414 mit unterschiedlicher Rührerkonfiguration und Substratkonzentration.	134
Abb. 5.5.2: Proteinkonzentration und Polygalacturonaseaktivität bei Satzkultivierungen des <i>A. niger</i> Produktionsstamms aKS055 im 0,7 und 3 L Maßstab.....	135
Abb. 5.5.3: Prozessdaten der gekoppelten Polygalacturonaseproduktion und enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln im Satzverfahren.	139
Abb. 6.1.1: Polygalacturonaseaktivität und Zuckerkonzentrationen im Kulturüberstand während Kultivierungen von <i>A. niger</i> , Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln und Prozessintegration beider Prozessschritte.	143