

Herstellung von D-Xylitol aus Zuckerrübenpressschnitzeln mit *Aspergillus niger* Stämmen

Melanie Knesebeck

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Petra Mela

Prüfende der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 16.04.2025 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 07.07.2025 angenommen.

„Education is the most powerful weapon which you can use to change the world.“

Nelson Mandela (1918 – 2013)

Danksagung

Für die im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entstandene Arbeit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung sowie die Möglichkeit, dieses spannende Forschungsvorhaben zu bearbeiten. Vielen Dank für die engagierte Unterstützung, die Weitergabe wertvoller Erfahrungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. J. Philipp Benz für die Übernahme der Zweitbegutachtung sowie Prof. Dr. Petra Mela für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsgremiums.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Projektpartnern für die produktive Zusammenarbeit. Besonders danke ich Prof. Dr. J. Philipp Benz und Marcel Rüllke von der Professur für Pilzbiotechnologie der Holzwissenschaft der Technischen Universität München sowie Dr. Mislav Oreb von dem Institut der Biowissenschaften an der Goethe Universität Frankfurt am Main. Vielen Dank für die exzellente Projektkoordination, den inspirierenden Austausch und die stets konstruktive Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung dieses Projektes, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Bereitstellung der Zuckerrübenpressschnitzel bedanke ich mich bei Dr. Wolfgang Wach und der Südzucker AG.

Ein besonderer Dank gilt den Studierenden Davis, Julian, Maria, Sebastian und Shiyi für ihre engagierte Unterstützung im Labor. Ihr habt maßgeblich dazu beigetragen, dass die Arbeit nicht nur produktiv, sondern auch angenehm war.

Für die organisatorische und technische Unterstützung am Lehrstuhl danke ich Patrick, Nelson und Markus.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und die wunderbare gemeinsame Zeit. Mit euch hat sich die Arbeit oft nicht wie Arbeit angefühlt – ihr habt diesen Lebensabschnitt für mich zu einer unvergesslichen Zeit gemacht.

Meiner Familie und Stefan möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen für die bedingungslose Unterstützung, die Geduld und den immerwährenden Rückhalt. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung und Zielsetzung.....	3
3.	Theoretische Grundlagen	9
3.1.	<i>Aspergillus niger</i>	9
3.1.1.	Biologische Grundlagen von <i>Aspergillus niger</i>	9
3.1.2.	Wachstum und Morphologie filamentöser Pilze	11
3.1.3.	Sekretion hydrolytischer und pektinolytischer Enzyme in <i>A. niger</i>	13
3.1.4.	L-Arabinose Stoffwechsel zur D-Xylitolproduktion	15
3.2.	Bioprozesstechnik.....	16
3.2.1.	Kultivierung im Rührkesselreaktor	17
3.2.2.	Feststofffermentation	18
3.3.	Pektinreicher Agrarreststoff Zuckerrübenpressschnitzel	23
3.3.1.	Zuckerherstellung aus Zuckerrüben	24
3.3.2.	Zusammensetzung und Verwertung von Zuckerrübenpressschnitzel	26
3.3.3.	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel.....	28
3.4.	D-Xylitol.....	34
4.	Materialien und Methoden	37
4.1.	Mikroorganismus <i>Aspergillus niger</i>	37
4.2.	Reaktionsmedien, Substrate und Puffer	38
4.2.1.	Vorkulturmedium.....	38
4.2.2.	Spurenelementlösung	38
4.2.3.	Sporenlösung (NaCl-Tween)	39
4.2.4.	Analysepuffer (Natriumcitrat-Puffer)	39
4.2.5.	Zuckerrübenpressschnitzel	40
4.2.6.	Substrat zur Feststofffermentation	41
4.2.7.	Synthetisches Medium zur Kultivierung modifizierter D-Xylitol- produzierender Stämme	42
4.2.8.	Medium mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat	42
4.2.9.	Substrat für Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse	43
4.3.	Kultivierung von <i>A. niger</i>	44
4.3.1.	Stammhaltung.....	44
4.3.2.	Herstellung der Vorkultursporenlösung.....	44
4.3.3.	Vorkulturherstellung in Schüttelkolben.....	45

4.3.4.	Kultivierung von <i>A. niger</i> mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat in Schüttelkolben	45
4.3.5.	Integrierte Feststofffermentation und Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel im Liter-Maßstab	45
4.3.6.	Satzverfahren im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab	50
4.4.	Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel in 100 mL-Laborflaschen	54
4.5.	Analytische Methoden	54
4.5.1.	Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse	54
4.5.2.	Quantifizierung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand	55
4.5.3.	Quantifizierung der Zuckerkonzentrationen im Kulturüberstand	56
4.5.4.	Mikroskopie	57
5.	Prozessintegration von Enzymherstellung und enzymatischer Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel.....	59
5.1.	Enzymherstellung mit <i>A. niger</i> im Rührkesselreaktor.....	59
5.2.	Enzymherstellung mit <i>A. niger</i> im feuchten Haufwerk.....	64
5.3.	Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel	70
5.3.1.	Parameterstudien zur Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln	70
5.3.2.	Voruntersuchungen zur Prozessintegration von Enzymherstellung und enzymatischer Hydrolyse	76
5.4.	Integrierter Prozess in einem Bioreaktor	80
6.	Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol.....	95
6.1.	Charakterisierung von <i>A. niger</i> -Stämmen zur D-Xylitolproduktion	95
6.2.	Vermeidung der D-Xylitol-Metabolisierung im Satzverfahren.....	98
6.3.	D-Xylitolproduktion mit Hydrolysat	106
6.3.1.	Verwendbarkeit von Hydrolysat durch <i>A. niger</i>	106
6.3.2.	Umsetzung von vorbehandeltem Hydrolysat mit <i>A. niger</i>	109
7.	Zusammenfassung und Ausblick	115
8.	Literaturverzeichnis	121
9.	Abkürzungsverzeichnis	141
10.	Anhang	143
10.1.	Verwendete Chemikalien	143
10.2.	Geräte	146
10.3.	Verwendete Verbrauchsmaterialien	150
10.4.	Datenanhänge.....	153

1. Einleitung

Die Weltbevölkerung wächst stetig und wird bis 2050 voraussichtlich etwa 9,6 Milliarden Menschen erreichen (Pardey et al., 2014). Dies führt zu einem erhöhten Nahrungsmittelbedarf und steigender Ressourcennachfrage, während gleichzeitig der weltweite Ausstoß an Kohlenstoffdioxid reduziert werden muss. Diese Entwicklungen stellen die Menschheit vor großen Herausforderungen und erfordern ein Umdenken in vielen Bereichen. Insbesondere der Klimawandel macht innovativen Lösungen in der Industrie notwendig (Holechek et al., 2022). Die Kreislaufwirtschaft bietet einen Ansatz für eine nachhaltige und effiziente Nutzung nachwachsender Rohstoffe (Velasco-Muñoz et al., 2022). Ein zentraler Aspekt ist dabei die Konkurrenz zwischen landwirtschaftlichen Flächen für die Nahrungsmittelproduktion und dem Anbau nachwachsender Rohstoffe (Chen & Önal, 2016). Die Nutzung von Agrarreststoffen stellt eine vielversprechende Lösung dar, da diese in großen Mengen weltweit verfügbar sind und nicht mit der Lebensmittelproduktion konkurrieren (Koul et al., 2022; Sarkar et al., 2012). Ein Beispiel für einen solchen Agrarreststoff sind Zuckerrübenpressschnitzel, ein Nebenprodukt der Haushaltszuckerproduktion. Im Jahr 2019 fielen weltweit etwa 14 Millionen Tonnen Zuckerrübenpressschnitzel (Trockenmasse) als Reststoff bei der Saccharoseproduktion an (Muir & Anderson, 2021). Um diesen Agrarreststoff biotechnologisch verwerten zu können, müssen die enthaltenen Zuckermomere freigesetzt werden. Eine nachhaltige Methode hierfür ist die Verwendung von Enzymen, die gewöhnlich von Pilzen hergestellt werden. Ein bewährter Vertreter dieser Gruppe ist *Aspergillus niger*, der bereits in verschiedenen industriellen Prozessen eingesetzt wird (Cairns et al., 2021).

Die Hydrolyse von Pflanzenmaterial ist ein etabliertes Forschungsthema und wird unter anderem zur Produktion von Bioethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse eingesetzt (Wang et al., 2022). Ein Beispiel hierfür ist das sunliquid®-Verfahren der Clariant AG (Schweiz), das Bioethanol aus Weizenstroh erzeugt. Dieses Verfahren umfasst die Zerkleinerung und thermische Vorbehandlung des Rohstoffs Weizenstroh, gefolgt von einer enzymatischen Hydrolyse und Umwandlung der freigesetzten Zucker durch Mikroorganismen zu Ethanol. Die für die enzymatische Hydrolyse benötigten Enzyme wurden ebenfalls von spezialisierten Mikroorganismen produziert, die mit dem Weizenstroh kultiviert wurden. (Hortsch & Corvo, 2020) Die Skalierung des Prozesses auf industriellen Maßstab war jedoch wirtschaftlich nicht tragfähig, weshalb diese seit 2023 von der Clariant AG nicht weiterverfolgt wurde (Bolaño Losada et al., 2025). Um den Prozess der Agrarreststoffnutzung rentabler zu gestalten, könnte die Produktion höherwertiger Produkte eine Alternative darstellen.

L-Arabinose ist neben D-Glukose und D-Galakturonsäure eine der Hauptkomponenten von Zuckerrübenpressschnitzeln und kann von *A. niger* metabolisiert werden (Chroumpi et al., 2021; Hutnan et al., 2000; Meng et al., 2022; Usmani et al., 2022). Ein Zwischenprodukt der L-Arabinose Metabolisierung ist D-Xylitol (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022). Dieser Zuckeraustauschstoff D-Xylitol ist ein vielversprechendes Produkt, das nicht nur karieshemmende Eigenschaften besitzt und daher in Zahnpasta und Kaugummis verwendet wird, sondern auch positive Effekte auf das Immunsystem, die Verdauung sowie auf Fettleibigkeit und Diabetes zeigt (Gasmi Benahmed et al., 2020). Es wird erwartet, dass mit D-Xylitol bis 2027 ein Marktwert von 6,93 Milliarden US-Dollar erreichen wird bei einer durchschnittlichen jährlichen Wachstumsrate von 6,4 % (Mathur et al., 2023). Die mikrobielle Herstellung von D-Xylitol aus dem Agrarreststoff Zuckerrübenpressschnitzel stellt somit eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Produktionsverfahren dar.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Die Nutzung von Zuckerrübenpressschnitzel als Rohstoff für weiterführende Biotransformationsprozesse stellt eine Herausforderung dar, bietet jedoch mehrere Vorteile für eine biotechnologische Verwertung. Da Zuckerrübenpressschnitzel als Nebenprodukt der Saccharosegewinnung anfallen, durchlaufen sie bereits eine thermische Vorbehandlung. Außerdem besitzen sie einen geringen Ligningehalt, was ihre enzymatische Hydrolyse erleichtert. (Schmitz et al., 2019) Daher eignen sie sich prinzipiell als Ausgangsmaterial für die Herstellung verschiedener Produkte in den Bereichen Ernährung, Kosmetik und pharmazeutisch aktiver Substanzen (Finkenstadt, 2014).

Zuckerrübenpressschnitzel bestehen hauptsächlich aus den Biopolymeren Pektin, Cellulose und Hemicellulose, sowie in geringen Anteilen aus Lignin und Proteinen (Cárdenas-Fernández et al., 2018; Hutnan et al., 2000; Usmani et al., 2022). Für die weitere biotechnologische Verwertung des Rohstoffes müssen Monomere freigesetzt werden. Die Hauptzuckermonomere sind D-Glukose, L-Arabinose und D-Galakturonsäure (Cárdenas-Fernández et al., 2018; Hutnan et al., 2000; Usmani et al., 2022).

Zur Spaltung der Polysaccharide in ihre Monomere stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, darunter saure Hydrolyse, hydrothermische Methoden und enzymatische Hydrolyse (Chamy et al., 1994; Levigne et al., 2002; Micard et al., 1996). Während thermo-chemische Methoden oft mit einem hohen Energieverbrauch und der Freisetzung wachstumsinhibierender Abbauprodukte verbunden sind (Leijdekkers et al., 2013; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000), stellt die enzymatische Hydrolyse eine umweltfreundlichere Alternative dar. Sie erfolgt unter milden Bedingungen mit niedrigen Temperaturen und pH im neutralen Bereich und führt seltener zur Freisetzung inhibierender Abbauprodukte bei ligninhaltigen Rohstoffen (Cherry & Fidantsef, 2003; Leijdekkers et al., 2013; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

In industriellen enzymatischen Hydrolyseprozessen, wie beispielsweise der Herstellung von Cellulose-Ethanol, stellt die Produktion von Cellulasen einen erheblichen Kostenfaktor dar, weshalb die Reduzierung der Enzymkosten entscheidend für die wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit des Verfahrens ist (Johnson, 2016). Filamentöse Pilze sind bewährte Produzenten hydrolytischer Enzyme, insbesondere von Cellulasen und Hemicellulasen (Bala & Singh, 2015). Der industriell oft eingesetzte Pilz *Aspergillus niger* zeigt zudem pektinolytische Aktivitäten, die durch eine gezielte Deletion des

Pektinase-Regulators GaaX weiter gesteigert werden konnten (Cairns et al., 2018; Niu et al., 2017).

Bereits durchgeführte Untersuchungen zur Nutzung von Zuckerrübenpressschnitzel haben gezeigt, dass diese als Substrat für die Enzymproduktion mit einem gentechnisch optimierten *A. niger*-Stamm zur erhöhten Polygalacturonase-Sekretion genutzt werden können. In diesen Vorarbeiten wurden Zuckerrübenpressschnitzel in Suspension als Ausgangsmaterial für die Enzymproduktion verwendet. Die produzierten hydrolytischen Enzyme konnten anschließend zur enzymatischen Hydrolyse weiterer Zuckerrübenschnitzel eingesetzt werden. Im Allgemeinen werden die Enzymproduktion und enzymatische Hydrolyse getrennt durchgeführt. In der Vorarbeit wurde auch ein Verfahren untersucht, das beide Prozessschritte in einem Bioreaktor integriert. (Schäfer, 2022) Dadurch entfällt die separate Aufreinigung der Enzyme und die Gesamtprozesszeiten werden verkürzt, was zu erheblichen Kosteneinsparungen führt (Maehara et al., 2018; Pirota et al., 2013).

Nach einer Enzymproduktionszeit von 83 h mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ wurden im selben Bioreaktor frische Zuckerrübenpressschnitzel hinzugefügt, nachdem die Temperatur auf 50 °C erhöht wurde, um *A. niger* zu inaktivieren. Nach 71 h enzymatischer Hydrolyse wurden aus 75 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel finale Zuckerkonzentrationen von 13,6 g L⁻¹ D-Glukose, 13,0 g L⁻¹ L-Arabinose, 10,7 g L⁻¹ D-Galakturonsäure sowie 5,5 g L⁻¹ D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose und D-Fruktose im Hydrolysat freigesetzt. Dies entspricht einer Gesamtzuckerkonzentration von 42,8 g L⁻¹. (Schäfer, 2022)

Ein spezifisches Problem der enzymatischen Hydrolyse von Agrarreststoffen ist die vergleichsweise geringe Zuckerkonzentration im Hydrolysat. Dies kann in nachfolgenden Biotransformationsprozessen zu niedrigen Produktkonzentrationen führen (Chen et al., 2007; Xu et al., 2016). Eine mögliche Lösung besteht in der Verwendung höherer Feststoffkonzentrationen während der Hydrolyse. Deshalb wird in dieser Arbeit der beschriebene integrierte Ansatz weiterverfolgt, um einen höheren Feststoffanteil von Zuckerrübenpressschnitzel einzusetzen. Durch den Einsatz einer feuchten Schüttung von Zuckerrübenpressschnitzeln, angeimpft mit *A. niger*-Sporen, wird auf eine Wasserphase verzichtet, so dass die Gasphase als kontinuierliche Phase während der Fermentation dient. Somit fallen weniger Abwasserströme an, was die wirtschaftliche Nutzung von Agrarreststoffen zusätzlich begünstigt (Castilho et al., 2000; Gowthaman et al., 2001; Melnichuk et al., 2020; Roukas & Kotzekidou, 2020). Die Enzyme können nach der Produktion von dem Feststoff heruntergewaschen werden, bevor im selben Bioreaktor frische Zuckerrübenpressschnitzel zugegeben und

hydrolysiert werden. Eine Herausforderung besteht darin, dass der enzymproduzierende Mikroorganismus *A. niger* die freigesetzten Zucker während der Hydrolyse nicht verstoffwechseln darf. Dies kann entweder durch genetische Modifikationen oder durch Anpassung der Prozessstrategie gelöst werden. Durch erhöhte Temperaturen während der Hydrolyse kann der Pilz wie zuvor inaktiviert werden. Obwohl Zuckerrübenpressschnitzel aufgrund ihres geringen Ligningehalts als gut zugänglicher Rohstoff für die enzymatische Hydrolyse gelten, bleibt zu untersuchen, inwiefern bei diesem Prozess unerwünschte Nebenprodukte entstehen könnten, die potenziell eine nachfolgende Biotransformation beeinflussen. Das Ziel dieses integrierten Prozesses von Enzymherstellung und Hydrolyse ist, möglichst hohe Zuckerkonzentrationen zu erreichen und ein effizientes Verfahren zur Verzuckerung von Zuckerrübenpressschnitzel als Rohstoff zu ermöglichen.

Das durch Hydrolyse aus Zuckerrübenpressschnitzel gewonnene Hydrolysat bietet vielseitige Nutzungsmöglichkeiten für die biotechnologische Produktion unterschiedlicher Wertstoffe. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass aus der freigesetzten D-Galakturonsäure die Plattformchemikalie L-Galaktonat biotechnologisch hergestellt werden kann (Harth et al., 2020; Wagner et al., 2021). Eine weitere Hauptkomponente des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats mit einem Anteil von etwa 21 % ist L-Arabinose (Micard et al., 1996).

D-Xylitol ist ein vielseitig einsetzbarer Zuckeralkohol mit hohem Anwendungspotenzial im Gesundheitsbereich. Seine karieshemmenden Eigenschaften sowie der geringe Kaloriengehalt machen es zu einer idealen Zutat für Produkte wie Kaugummi, Zahnpasta und als Zuckerersatz für Diabetiker oder Menschen mit Adipositas (Gasmi Benahmed et al., 2020). Darüber hinaus gilt D-Xylitol als vielversprechende Ausgangsverbindung für verschiedene Produkte, die derzeit aus fossilen Rohstoffen gewonnen werden, darunter Propylenglykol, Glycerol und Xylarsäure. Marktprognosen schätzen den globalen Wert von D-Xylitol im Jahr 2027 auf 6,93 Milliarden US-Dollar. (Mathur et al., 2023)

Derzeit wird D-Xylitol hauptsächlich aus Birkenholz in einem energieintensiven chemischen Verfahren hergestellt. Dieser Prozess umfasst vier Hauptschritte: saure Hydrolyse, Aufreinigung zur Gewinnung von D-Xylose, katalytische Hydrierung zu D-Xylitol und abschließende Reinigung durch Kristallisation. Aufgrund des hohen Energiebedarfs ist dieser Prozess mit hohen Produktionskosten verbunden. Eine umweltfreundlichere Alternative stellt die biotechnologische Umwandlung von D-Xylose zu D-Xylitol mithilfe gentechnisch modifizierter Hefen dar. (Mathur et al., 2023) Es wurde bereits demonstriert, dass D-Xylose durch gentechnisch veränderte *Saccharomyces cerevisiae* in D-Xylitol umgewandelt werden kann (Regmi et al., 2024).

L-Arabinose eignet sich als Substrat für die biotechnologische Herstellung von D-Xylitol mithilfe gentechnisch modifizierter *A. niger*-Stämme (Rüllke, Schönrock et al., 2024).

Durch gezielte Deletionen im Pentose-Katabolismus kann *A. niger* so modifiziert werden, dass D-Xylitol nicht weiter verstoffwechselt, sondern angereichert wird. Dies kann durch das Entfernen der Gene für D-Xylitol-Dehydrogenase, D-Sorbitol-Dehydrogenase und D-Xylulose-Kinase erreicht werden. Dadurch wird die Einspeisung von D-Xylitol in den Pentosephosphatweg verhindert. (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022; Rüllke, Schönrock et al., 2024)

Ein solcher modifizierter *A. niger*-Deletionsstamm, in dem zusätzlich einen Transporter für den Export von D-Xylitol integriert wurde, erreichte in synthetischem Medium im Schüttelkolben Ausbeuten von 0,45 g D-Xylitol g⁻¹ L-Arabinose (Rüllke, Schönrock et al., 2024).

Um das Potential dieser Biotransformation zu evaluieren, sind zunächst Untersuchungen mit synthetischem Medium unter definierten Bedingungen im kontrollierten Rührkesselreaktor notwendig. Ziel ist es, eine möglichst hohe D-Xylitolausbeute und Konzentration in kurzer Zeit zu erzielen. Eine Herausforderung dabei könnte sein, dass der Pilz trotz der genetischen Modifikationen weiterhin D-Xylitol verstoffwechselt, was durch verfahrenstechnische Anpassungen gezielt verhindert werden könnte. Eine Möglichkeit besteht wie zuvor darin, *A. niger* durch einen Begasungsstopp zu inaktivieren, sobald das Edukt L-Arabinose vollständig umgesetzt ist.

Entscheidend ist jedoch die Verwertbarkeit des zuvor hergestellten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats zur Herstellung von D-Xylitol aus L-Arabinose. Die anderen Zucker im Hydrolysat könnten zum Wachstum von *A. niger* genutzt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit synthetischem Medium zur D-Xylitolherstellung mit genetisch modifizierten *A. niger*-Stämmen können Unterschiede im Prozessverlauf mit realem Hydrolysat identifiziert und der Prozess gegebenenfalls angepasst werden.

Gesamtziel ist die Nutzung von Zuckerrübenpressschnitzel durch enzymatische Hydrolyse und anschließende Biotransformation der freigesetzten L-Arabinose zu D-Xylitol. Eine schematische Darstellung dieses zweistufigen Prozessansatzes ist in Abbildung 2.1.

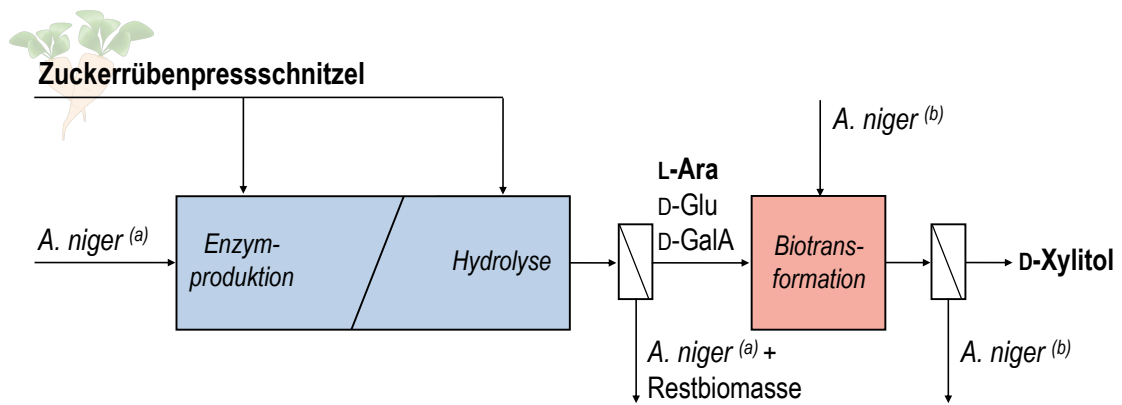


Abbildung 2.1: Konzept für einen integrierten ersten Prozessschritt bestehend aus Enzymproduktion mit *A. niger*^(a) und enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln bei hohen Feststoffkonzentrationen und nachfolgender Biotransformation. Das gewonnene Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat mit den Hauptkomponenten L-Arabinose (L-Ara), D-Glukose (D-Glu) und D-Galakturonsäure (D-GalA) wird anschließend für die Biotransformation mit einem weiteren *A. niger*^(b)-Stamm zur D-Xylitolproduktion genutzt. Die im ersten Schritt freigesetzte L-Arabinose dient als Edukt für die D-Xylitolproduktion, während die anderen Zucker als Kohlenstoffquelle für das Wachstum von *A. niger*^(b) genutzt werden sollen.

3. Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen allgemeinen Überblick über die Nutzung von Zuckerrübenpressschnitzel als Rohstoff für die Herstellung von D-Xylitol mit *Aspergillus niger*. Dabei wird die Verwendung von *A. niger* als Produzent von hydrolytischen Enzymen und Ganzzellbiokatalysator in der biotechnologischen Industrie näher betrachtet. Zudem wird die Bioprozesstechnik für die Kultivierung von *A. niger* erläutert. Anschließend werden Zuckerrübenpressschnitzel als Nebenprodukt der Saccharoseproduktion vorgestellt, wobei insbesondere die Zusammensetzung von Zuckerrübenpressschnitzel sowie die Freisetzung der Monomere durch Hydrolyse betrachtet werden, um sie für Biotransformationen nutzbar zu machen.

3.1. *Aspergillus niger*

3.1.1. Biologische Grundlagen von *Aspergillus niger*

A. niger ist ein filamentöser Pilz und zählt zu den Schlauchpilzen (Ascomycota). Er kommt in der Natur vorzugsweise in Erde, Kompost und auf verrottendem Pflanzenmaterial vor. Der Pilz wird aufgrund seiner Schwarzfärbung zur Sektion *nigri* innerhalb der *Aspergillus*-Spezies zugeordnet (Abbildung 3.1) (Varga et al., 2014).

Weltweit sind etwa 300 – 350 *Aspergillus*-Arten bekannt, wodurch diese Gattung zu den am weitesten verbreiteten Pilzgruppen auf der Erde zählt. *Aspergillus*-Arten können sich auf verschiedene Weisen fortpflanzen. Dazu gehören sowohl die sexuelle als auch die asexuelle Reproduktion. Bei beiden Vermehrungsarten werden zunächst Hyphen gebildet, die entweder aus einem einzelnen Konidium (asexuelle Reproduktion) oder einer Ascospore (sexuelle Reproduktion) hervorgehen. *A. niger* ist jedoch ausschließlich zur asexuellen Reproduktion befähigt. Bei der asexuellen Reproduktion differenzieren sich nach einer vegetativen Wachstumsphase die Lufthyphen in sogenannte Konidiophoren. An diesen Konidiophoren bilden sich dann einkernige, runde Konidiosporen mit einem Durchmesser von 4 – 6 µm. (Varga et al., 2014; Whitehead et al., 2021) Die vollständige Genomsequenz von *A. niger* wurde erstmals 2007 veröffentlicht (Pel et al., 2007).

A. niger zeigt ein breites Spektrum an Wachstumsbedingungen, mit Temperaturen von 6 – 47 °C. Die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch bei 35 – 37 °C. Der Pilz toleriert ein weites pH-Spektrum von pH 1,4 bis pH 9,8 und benötigt eine Wasseraktivität von mindestens 0,88, wobei eine Wasseraktivität von 0,97 als optimal gilt. (Lima et al., 2019; Schuster et al., 2002) Die Wasseraktivität beschreibt das für Reaktionen

verfügbare Wasser im Substrat und ergänzt die Angabe des reinen Wassergehalts (Mathlouthi, 2001). Der Pilz ist ein Saprophyt und ernährt sich chemoorganotroph durch die Aufnahme und den Abbau von organischen Verbindungen (Fuchs & Schlegel, 2007, S. 73; Ntana et al., 2020). *A. niger* wurde von der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel als unbedenklich für die Menschliche Gesundheit eingestuft, was den Einsatz des Pilzes für die Herstellung von Lebensmittel und Therapeutika ermöglicht (Schuster et al., 2002).

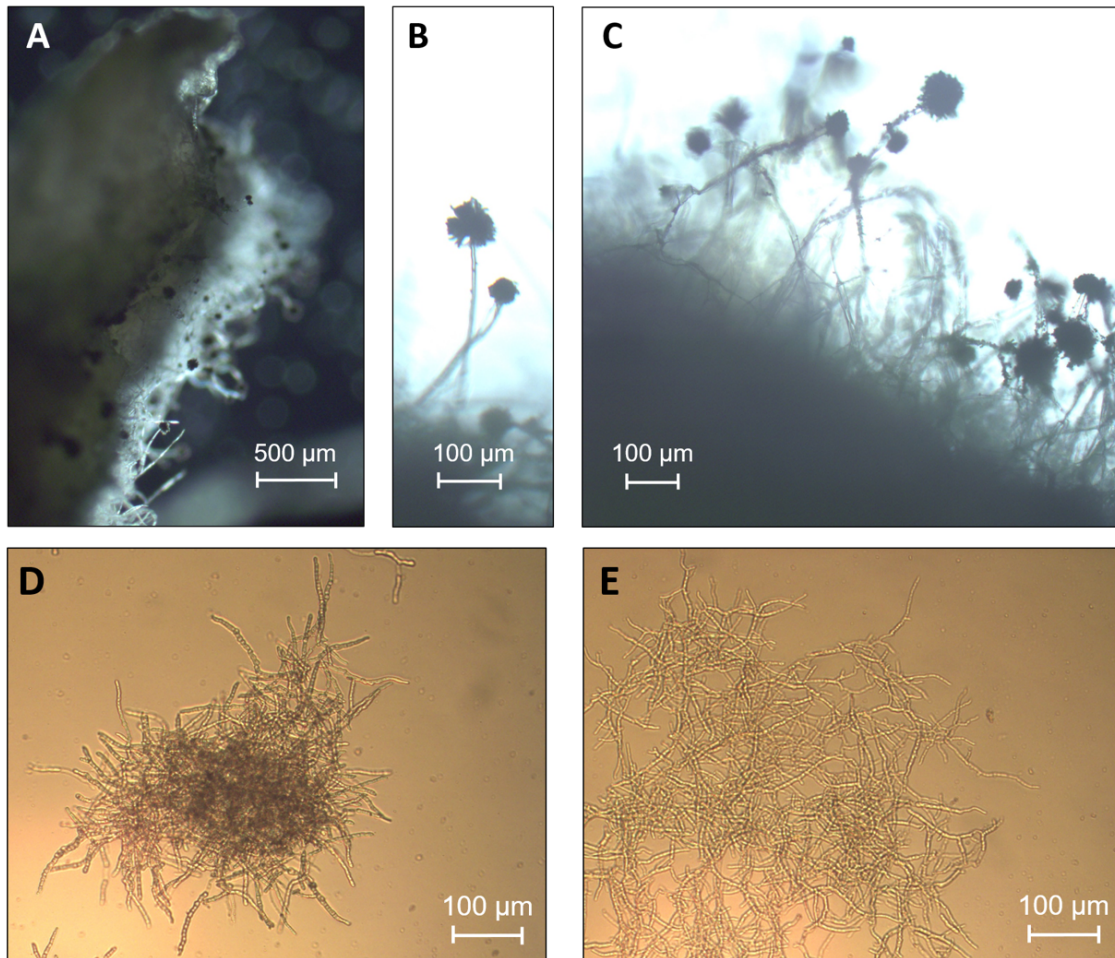


Abbildung 3.1: Mikroskopie Aufnahmen von *A. niger* bei Hyphenbildung und Wachstum auf Zuckerrübenschnitzel an der Luft (A-C) und in Flüssigmedium mit pelletartigem (D) und dispersem, myzelartigem Wachstum (E).

Industriell wird *A. niger* seit 1919 für die biotechnologische Produktion von Zitronensäure aus einfachen Zuckern genutzt (Cairns et al., 2021; Schuster et al., 2002). Dabei können Produktkonzentrationen von mehr als 200 g L^{-1} erreicht werden (Cairns et al., 2021; Kück et al., 2009). Etwa 20 Jahre später wurde eine weitere organische Säure, die Gluconsäure, mit Produktkonzentrationen von bis zu 80 g L^{-1} industriell erfolgreich mit diesem Pilz hergestellt. Zudem wird *A. niger* seit den späten 1950er Jahren auch für die Produktion von Enzymen eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise die Enzyme

Lactoferrin, Lipase, Arabinase, Asparaginase, Catalase, Cellulase, Pektinase und weitere. Das erfolgreichste Enzym ist jedoch die Glucoamylase, die zur Verzuckerung von Stärke zu Glukose verwendet wird und bei der Herstellung Produktkonzentrationen von bis zu 30 g L⁻¹ des Enzyms erreicht werden. Darüber hinaus wird *A. niger* für die Produktion von sekundären Metaboliten verwendet. Ein Beispiel dafür ist die heterologe Produktion einer nicht-ribosomalen Peptid Synthetase aus *Fusarium oxysporum* in *A. niger*, die die Bildung des zyklischen Depsipeptids von Enniatin katalysiert. Enniatine wiederum besitzen antimikrobielle, antivirale und krebshemmende Eigenschaften (Cairns et al., 2021; Richter et al., 2014). Wichtiger Einflussfaktoren für den Einsatz von *A. niger* als Produktionsstamm ist das Wachstum und die Morphologie.

3.1.2. Wachstum und Morphologie filamentöser Pilze

Während des Wachstums von *A. niger* ist die Ausbildung verschiedener Morphologien möglich. Dabei wird zum einen zwischen der Mikromorphologie und der Makromorphologie unterschieden. Erstere beschreibt das Auskeimen und das Hyphenwachstum, während die Makromorphologie zwischen freiem dispersem Myzel, Pellets und Mischformen davon unterscheidet (Krull et al., 2010).

Die Mikromorphologie beginnt mit dem Auskeimen von Sporen. Anschließend bilden sich Hyphen, die durch das Ausdehnen der endständigen Zellen an ihrer Spitzen und durch Verzweigung wachsen (Krull et al., 2010; Madigan & Martinko, 2011, S. 529–531). Die Gesamtheit aller verzweigten Hyphen bilden das Myzel (Lin et al., 2014). In den Pilzhypen befinden sich oft bis zu mehreren Hunderten Zellkerne, was auch als Synzytium bezeichnet wird und typischerweise als eine mit Zellkernen und Cytoplasma gefüllte Röhre aufgebaut ist. Aus dem Myzel heraus können sich Lufthyphen bilden, an deren spezialisiertem Ende der Konidienträger entsteht. Am Konidienträger bilden sich asexuelle Sporen, die sogenannten Konidien. An der Spitze des Konidienträgers bilden sich am Vesikel sogenannte Phialide, an denen sich die Konidien durch zelluläre und physiologische Veränderungen von einem unreifen zu einem reifen Zustand entwickeln. Dazu gehört zum einen die Biosynthese von Trehalose in den Konidien zur erhöhten Toleranz gegenüber äußeren Belastungen wie beispielsweise hohe Temperaturen. Zudem werden die Konidienwände gegen Austrocknung und verschiedene Schäden modifiziert. (Madigan & Martinko, 2011, S. 529–531; Svanström et al., 2014) Anschließend verbleiben die ausgereiften Konidien in einem Ruhestadium, bis sie auf eine geeignete Umgebung zum Keimen treffen (Son et al., 2023). Die Schwarzfärbung der *A. niger* Konidien kommt vom enthaltenen Melanin (Teertstra et al., 2017). Einige *Aspergillus*-Arten können auch durch Verschmelzung zweier haploider Zellen sexuelle Sporen bilden, jedoch gehört *A. niger* nicht dazu (Dyer & O'Gorman, 2011). Der

strukturelle Aufbau von *A. niger* und der Zyklus von der Auskeimung bis zur Sporenbildung sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

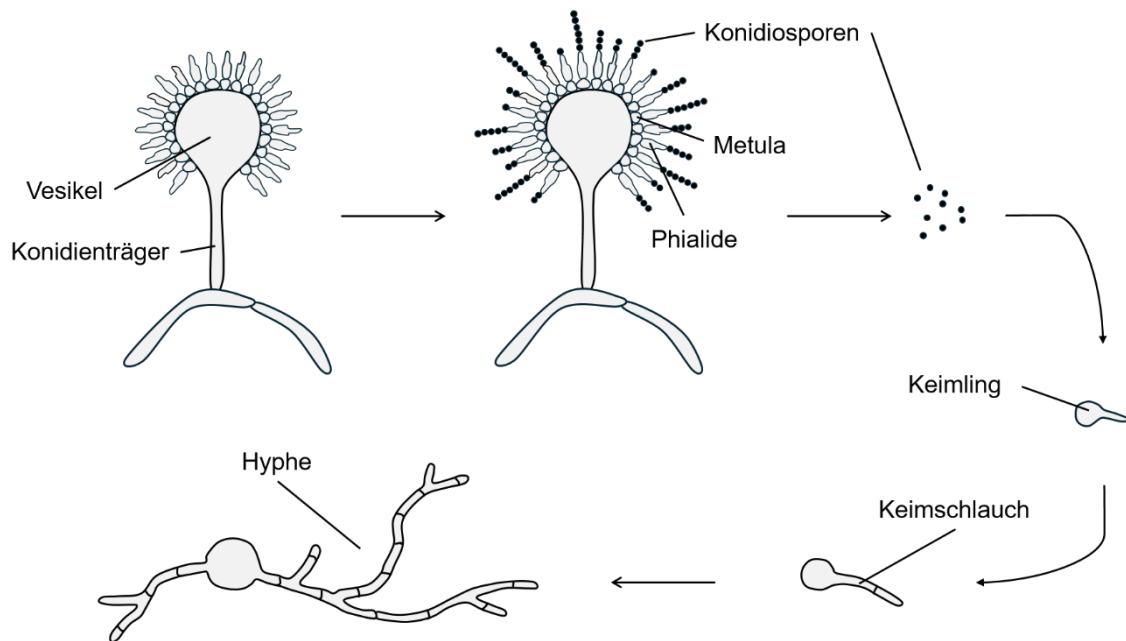


Abbildung 3.2: Schematischer und Struktureller Aufbau von *A. niger* und der Zyklus von der Sporen- bis zur Hyphenbildung adaptiert nach Fuchs und Schlegel (2007), Kück et al. (2009), Lin et al. (2014), Madigan und Martinko (2011).

Die Makromorphologie nach dem Auskeimen von *A. niger* in Flüssigmedium kann unterschiedliche Formen annehmen. Dazu gehört die Ausbildung von Pellets, Wachstum als freies disperses Myzel und Mischformen. Beeinflusst wird die Makromorphologie durch die Gene, die Art und die Konzentration des Inokulums sowie die Kultivierungsbedingungen. Dazu gehören die chemische Zusammensetzung des Mediums sowie die Temperatur, der pH und der Leistungseintrag (Meyer et al., 2021). Die Morphologie kann auch Einfluss auf die Produktivität haben, weshalb für Pilzfermentationen bestimmte Morphologien bevorzugt werden. Beispielsweise wird myzelartiges Wachstum für die Produktion von Pektinasen bevorzugt, während pelletförmiges Wachstum für die Produktion von Zitronensäure von Vorteil ist (Driouch et al., 2010; Krull et al., 2010). Pellets entstehen durch das Agglomerieren von Konidien zu Beginn der Auskeimungsphase (Krull et al., 2010; Veiter et al., 2018). Der Vorteil von der Ausbildung von Pellets ist eine erhöhte Toleranz gegenüber Scherkräften und eine niedrige Viskosität der Fermentationsbrühe zu bewirken. Jedoch können Pellets aufgrund der schlechten Sauerstoffdiffusion dichte, inaktive Kerne aufweisen, was zur Zelllyse und zum Verlust der inneren Pelletstruktur führen kann. (Hille et al., 2009) Insgesamt führt dies zu verringerten Wachstumsraten und damit zu einer verringerten wachstumsassoziierten Produktbildung (Meyer et al., 2021).

Im Gegensatz dazu hat die Ausbildung von freiem dispersem Myzel andere indirekte Auswirkungen auf die Produktivität. Das Wachstum ist schnell und die Einschränkungen hinsichtlich des Nährstofftransports sind geringer, jedoch ist die Anfälligkeit für Scherbeanspruchung höher. Darüber hinaus bewirken sie eine höhere Viskosität des Mediums, was wiederum die Sauerstoffübertragungsrate verringert. (Driouch et al., 2010; Meyer et al., 2021; Papagianni & Matthey, 2006) Die Morphologie von *A. niger* hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymproduktion.

3.1.3. Sekretion hydrolytischer und pektinolytischer Enzyme in *A. niger*

A. niger wird seit den späten 1950er Jahren für die Produktion unterschiedlichster Enzyme genutzt (Cairns et al., 2021). Vorteile dieses filamentösen Pilzes für seine industrielle Nutzung in der Enzymproduktion sind die Fähigkeit der Proteinsekretion und die metabolische Vielseitigkeit (Oliveira et al., 2024). Aufgrund der saprophytischen Lebensweise besitzt *A. niger* bereits die Fähigkeit, eine große Menge an Enzymen zu produzieren und zu sekretieren, um organische Stoffe abzubauen und sich davon zu ernähren (Ntana et al., 2020). Die von *A. niger* gebildeten Proteine werden vor der Sekretion durch unterschiedliche Mechanismen in der Zelle auf die Qualität geprüft. Zunächst werden die Proteine zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert, und dort finden posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Bildung von Disulfidbrücken und die Proteinfaltung statt. Im ER kann es bei Anreicherung von fehlgefaltet oder nicht gefalteten Proteinen zur Aktivierung von Stressreaktionswegen in der Zelle kommen, zu denen die ungefaltete Proteinantwort oder der ER-assoziierte Degradationsweg gehören. (Geysens et al., 2009; Ntana et al., 2020)

Der klassische Weg der Proteinsekretion umfasst den Transport von mit Proteinen beladenen Vesikeln entlang von Mikrotubuli und Aktinfilamenten vom endoplasmatischen Retikulum bis zur Hyphenspitze. Die Vesikel werden dabei zunächst zum Golgi-Apparat transportiert, wo weitere Glykosylierungen stattfinden. Anschließend sammeln sich die Vesikel dann am sogenannten Spitzenkörper. Dort verschmelzen sie mittels eines Multiproteinkomplexes, den sogenannten Exozysten, mit der Plasmamembran, und die Proteine werden somit freigesetzt. (Cairns et al., 2021; Ntana et al., 2020; Oliveira et al., 2024) Neben dem klassischen Weg der Proteinsekretion wird vermutet, dass Proteine auch über Septumverbindungen in den Hyphen sekretiert werden können. In Kulturüberständen von *A. niger* wurden bereits Proteine gefunden, die das Sekretionssignal für die Translokation ins endoplasmatische Retikulum nicht besitzen. (Cairns et al., 2021)

Die wichtigsten industriell genutzten und von *A. niger* produzierten Enzyme sind sogenannte kohlenhydrataktive Enzyme und werden von der Katabolitrepression reguliert. Diese Enzyme katalysieren den Abbau von Polymeren in Biomasse zu deren Einzelbestandteilen, den Monosacchariden. Die Gene, die für diese Enzyme kodieren, werden im Allgemeinen als Reaktion auf induzierende und repressierende Kohlenstoffquellen transkriptionell reguliert, aber die molekularen Mechanismen der Regulation sind noch nicht vollständig geklärt. (Kunitake et al., 2022; Wang et al., 2024)

Die Kohlenstoff-Katabolit-Repression (CCR, englisch: *carbon catabolite repression*) ist ein Mechanismus, der in Gegenwart von leicht verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen wie D-Glukose wirkt und die Unterdrückung von Genen bewirkt, die an der Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind. In filamentösen Pilzen wird die Expression von Genen für Enzyme, wie Amylase, Cellulase und Hemicellulase, die zum Abbau von Polysacchariden notwendig sind, durch CCR kontrolliert. Wenn die bevorzugte Kohlenstoffquelle D-Glukose vorhanden ist, führt die Katabolitrepression zur Inaktivierung der Metabolisierung anderer Kohlenstoffquellen. Sobald keine D-Glukose zur Verfügung steht, werden die Gene zum Abbau anderer Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Cellulose und Stärke, aktiviert. Dies ermöglicht es Organismen wie *A. niger*, sich an ihre Umwelt anzupassen und möglichst effizient Enzyme zu produzieren. (Rüllke, Meyer et al., 2024; Wang et al., 2024)

In *Aspergillus* ist der Transkriptionsfaktor CreA an der CCR beteiligt, wobei er die Genexpression durch direkte Bindung an die Promotoren der Zielgene unterdrückt. Des Weiteren ist der cAMP-Stoffwechselweg an der CreA-abhängigen CCR beteiligt, da die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase die subzelluläre Lokalisierung, Phosphorylierung und Stabilität von CreA beeinflusst. Außerdem wird die CreA-unabhängige CCR ebenfalls durch den cAMP-Signalweg reguliert, insbesondere in Bezug auf die Cellulase-Genexpression. Dabei wird die CreA-unabhängige CCR durch verschiedene Monosaccharide ausgelöst, vor allem durch Hexosen wie D-Glukose und D-Mannose. Bei Pentosen ist die CreA-abhängige CCR der vorherrschende Mechanismus. (Kunitake et al., 2022)

Pflanzliche Biomassen mit hohem Pektinanteil kann ebenfalls von den durch *A. niger* sekretierten Enzymen abgebaut werden. Die Regulation dieser pektinolytischen Enzyme in *A. niger* erfolgt über den Transkriptionsfaktor GaaR. Dabei wirkt eine derivatisierte Form der D-Galakturonsäure, dem Monomer des Pektinrückgrats, als spezifischer Induktor. Sie bindet an den Repressor GaaX und aktiviert somit die Produktion von Pektinasen. Eine Deletion der Gene für den Repressor GaaX in *A. niger* führte zur konstitutiven Expression der GaaR-regulierten Gene. (Schmitz et al., 2019) Neben der

D-Galakturonsäure kann *A. niger* auch L-Arabinose verstoffwechseln (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022).

3.1.4. L-Arabinose Stoffwechsel zur D-Xylitolproduktion

Der filamentöse Pilz *A. niger* kann durch die Sekretion verschiedener Enzyme aus pflanzlichen Polymeren Monosaccharide freisetzen und diese über eine Vielzahl von Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung und zum Wachstum nutzen. Diese Polymere kommen in Pflanzen einerseits als Speichermedium wie Stärke vor, andererseits als Bestandteil der pflanzlichen Zellwand, beispielsweise Cellulose, Hemicellulose und Pektin. Neben dem zentralen Stoffwechselweg der Glykolyse existieren auch Stoffwechselwege zur Metabolisierung anderer Hexosen und Pentosen. (Kowalczyk et al., 2017; Li et al., 2022)

Neben D-Glukose zählt D-Fructose zu den präferierten Kohlenstoffquellen für *A. niger*. Weitere Hexosen, die von dem Pilz metabolisiert werden können, sind D-Galactose, D-Mannose, D-Galakturonsäure und D-Rhamnose. Diese werden über spezifische Stoffwechselwege umgewandelt und gelangen anschließend ebenfalls in die Glykolyse. (Li et al., 2022)

Die Pentosen L-Arabinose und D-Xylose werden in *A. niger* über den Pentose-Katabolismus in Zwischenprodukte umgewandelt bis zur D-Xylulose, das wiederum in den Pentosephosphatweg (PPP) eintritt. Ein Zwischenprodukt dieses Prozesses ist D-Xylitol (Li et al., 2022; Meng et al., 2022). Der Stoffwechselweg mit den Intermediaten der L-Arabinose- und D-Xylose-Metabolisierung ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die Zucker D-Xylose und L-Arabinose werden nach dem Transport in die Zelle über verschiedene Enzyme zu D-Xylitol biotransformiert. Der erste Schritt ist die Umwandlung von D-Xylose und L-Arabinose mittels der Enzyme D-Xylose-Reduktase (XyrA, XyrB) oder der NADPH-abhängigen L-Arabinose-Reduktase (LarA) zu D-Xylitol beziehungsweise L-Arabitol. Anschließend erfolgt die Biotransformation von L-Arabitol zu L-Xylulose über die Enzyme L-Arabitol-Dehydrogenase (LadA), Xylitol-Dehydrogenase (XdhA) oder Sorbitol-Dehydrogenase (SdhA) unter Verbrauch des Coenzym NAD⁺. (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022)

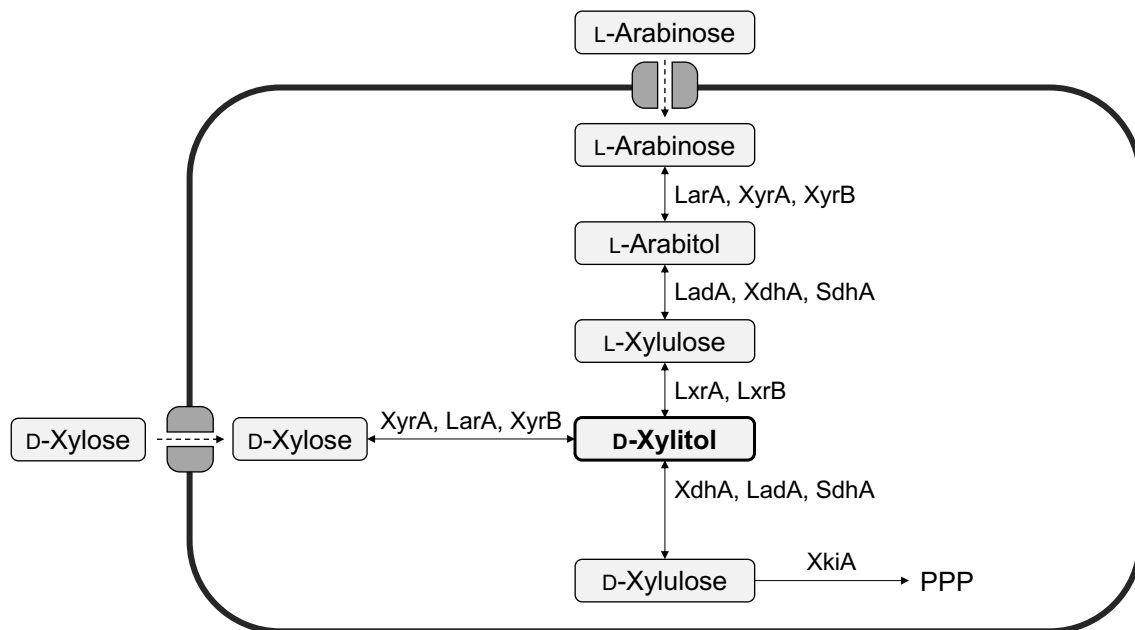


Abbildung 3.3: Der Stoffwechselweg von L-Arabinose und D-Xylose zu D-Xylitol in *A. niger* adaptiert nach Chroumpi et al. (2021) und Meng et al. (2022).

Im nächsten Schritt wird die gebildete L-Xylulose mittels L-Xylulose-Reduktasen (LxrA/LxrB) zu D-Xylitol umgewandelt, wobei NADPH benötigt wird. Das gebildete Zwischenprodukt D-Xylitol wird anschließend durch die Enzyme XdhA, LadA und SdhA zu D-Xylulose biotransformiert. Dieser Zucker wird durch weitere Umwandlungen mit der D-Xylulose-Kinase (XkiA) in Xylulose-6-Phosphat überführt und in den Pentosephosphatweg eingespeist. (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022)

Zur biotechnologischen Produktion von D-Xylitol mit *A. niger* ist ein vielversprechender Ansatz die gezielte Deletion der Enzyme XkiA, XdhA, LadA, und SdhA durchzuführen. Bei der Verwendung von L-Arabinose als Substrat muss jedoch beachtet werden, dass mindestens eines der Enzyme XdhA, LadA, SdhA ebenfalls für die Biotransformation von L-Arabitol zu L-Xylulose benötigt wird. Die genetische Deletion von XdhA führte jedoch zur höchsten Xylitol-Akkumulation in *A. niger*. (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022)

3.2. Bioprozesstechnik

Zur Kultivierung von *A. niger* können verschiedene Techniken im Labor angewendet werden. In diesem Kapitel werden die Prozesstechniken der Submerskultivierung und der Feststofffermentation vorgestellt und erläutert.

3.2.1. Kultivierung im Rührkesselreaktor

Submerse Kultivierungen können in durchmischten Bioreaktoren stattfinden. Hierbei erfolgt der Leistungseintrag durch mechanisch bewegte Einbauten. Die Aufgaben eines Bioreaktors sind hierbei das Homogenisieren des Mediums, das Suspendieren der unlöslichen Bestandteile, bei aeroben Prozessen das Dispergieren von Sauerstoff und zusätzlich wirkt er als Sterilbarriere für die Monokultur. Beim Satzverfahren wird das sterile Medium zu Beginn vorgelegt und anschließend mit dem ausgewählten Mikroorganismus inokuliert, um den Prozess zu starten. Während des Satzprozesses können im Bioreaktor die Prozessvariablen, wie Temperatur und pH, kontrolliert werden. (Chmiel & Weuster-Botz, 2018)

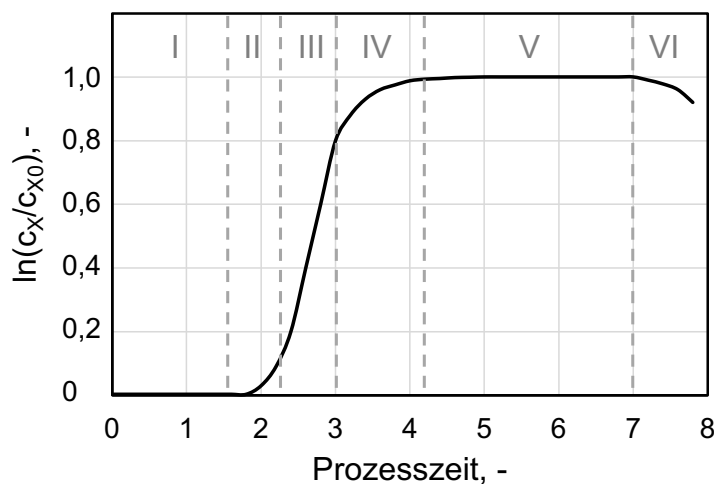


Abbildung 3.4: Logarithmische Darstellung der Wachstumskurve in Abhängigkeit der Zeit unter idealen Bedingungen im Rührkesselreaktor adaptiert nach Weuster-Botz und Takors (2018). I: Verzögerungsphase, II: erste Übergangsphase, III: exponentielle Wachstumsphase, IV: zweite Übergangsphase, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase.

Das Wachstum von einzelligen Mikroorganismen definiert sich als Zunahme der Zellmasse, wohingegen bei filamentösen Pilzen das Wachstum aufgrund der zunehmenden Größe und Dichte des Myzels stattfindet. Das Wachstum von Mikroorganismen in einem Satzverfahren kann in sechs Phasen eingeteilt werden. Die Biomassekonzentration c_x während des Wachstums von Mikroorganismen in Abhängigkeit der Zeit ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Zunächst beginnt die Verzögerungsphase, bei der oft nach der Inokulation eine Stagnation oder sogar Abnahme der Biomassekonzentration beobachtet wird. Anschließend erfolgt die erste Übergangsphase, in der sich die Mikroorganismen an die Reaktionsbedingungen anpassen und an das Substrat adaptieren. Es folgt die exponentielle Phase mit maximaler Wachstumsgeschwindigkeit. Am Ende dieser Phase, sobald das Substrat

verbraucht ist und sich inhibierende Stoffwechselprodukte gebildet oder sich die Reaktionsbedingungen geändert haben, erfolgt die zweite Übergangsphase. Diese geht dann in die stationäre Phase über, in der ein Gleichgewicht zwischen absterbenden Zellen und Wachstum besteht. Die letzte Phase ist die Absterbephase. (Antranikian, 2006; Weuster-Botz & Takors, 2018)

Bei filamentösen Mikroorganismen wie *A. niger* findet das Wachstum nicht aufgrund von Zellteilung statt, sondern über die Ausbildung eines Hyphennetzwerkes, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Daher muss in diesem Fall auch das Wachstumsmodell angepasst werden, denn das Wachstum findet dreidimensional durch Verlängerung der Hyphen oder durch Zunahme des Pelletdurchmessers statt. Weitere Parameter, die das Wachstum beeinflussen, sind Sporenbildung, Fragmentierung der Hyphen oder Stofftransportlimitierungen bei der Ausbildung von Pellet-Morphologie (Hille et al., 2009). Ein detaillierter mathematischer Ansatz für das Wachstum filamentöser Mikroorganismen ist in Weuster-Botz und Takors (2018) weiterführend beschrieben. Da *A. niger* in der Natur vor allem im Erdboden vorkommt (Schuster et al., 2002), eignet sich neben der Submerskultivierung auch die Feststofffermentation zur Kultivierung dieses Pilzes.

3.2.2. Feststofffermentation

Feststofffermentation bezeichnet die Kultivierung von Mikroorganismen auf der Oberfläche eines festen Kultursubstrats, das in der Regel aus einem feuchten Haufwerk pflanzlicher Biomasse besteht und kein freies Wasser enthält. Der Feststoff muss jedoch ausreichend Feuchtigkeit enthalten, um die Fermentation zu ermöglichen. Die kontinuierliche Phase der Fermentation mit einem feuchten Haufwerk ist die Gasphase. Häufig wird lignocellulosehaltige Biomasse für die Feststofffermentation verwendet. Wird ein Pilz für die Feststofffermentation eingesetzt, wächst das Myzel durch das Biomaterial hindurch und setzt dabei langsam Nährstoffe frei. (Chmelová et al., 2022; Pandey, 2003)

Vorteile von Feststofffermentation im Vergleich zur Submerskultivierung mit wasserbasierten Nährmedien sind ein geringerer Energiebedarf, weniger Abwasser und ein geringeres Risiko für Kontaminationen mit Bakterien (Pandey, 2003; Wang et al., 2023). Die für das Wachstum von Pilzen benötigte Wasseraktivität ist mit üblicherweise 0,5 bis 0,6 geringer als die für Bakterien mit 0,8 bis 0,9. Dies macht Pilze zu idealen Organismen für die Feststofffermentation, da dabei auch die Bedingungen ihres natürlichen Habitats nachgeahmt werden. (Wang et al., 2023) Zudem ist die Produktaufarbeitung im Vergleich zur Submerskultivierung einfacher, und dadurch können Kosten im Prozess reduziert werden (Yoon et al., 2014). Schwierigkeiten bei der

Feststofffermentation sind zum einen Stofftransportprobleme hinsichtlich Sauerstoff und eine erschwerte Wärmeregulierung, wodurch die Maßstabsvergrößerung für den industriellen Einsatz eine Herausforderung darstellt (Kumar et al., 2021; Pandey, 2003).

Die Feststofffermentation ist eine der ältesten Fermentationstechniken und wurde historisch für verschiedene biotechnologische Prozesse und Lebensmittelproduktion genutzt. Die Feststofffermentation wurde für die Herstellung von Penicillin eingesetzt, bis 1940 die Submersfermentation für Penicillin entwickelt war. (Kumar et al., 2021; Pandey, 2003; Singhanian et al., 2009) In den letzten Jahrzehnten hat das Interesse an der Forschung für Feststofffermentation wieder zugenommen, insbesondere in den Bereichen Bioreaktordesign, Prozessmodellierung und der Produktion mikrobieller Produkte wie Enzyme, Antibiotika oder Biokraftstoffe (Pandey, 2003). Ein Trend in der Feststofffermentation mit Pilzen ist die Verwendung von Reststoffen aus der Landwirtschaft als Substrat. Dabei wird vor allem lignocellulosehaltige Biomasse als günstige Kohlenstoffquelle eingesetzt, die nicht in Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion steht (Teigiserova et al., 2021; Wang et al., 2023). Die Struktureigenschaften des Substrats haben Einfluss auf das Pilzwachstum. Beispielsweise könnte die Zugänglichkeit zu Cellulose und Hemicellulose in ligninhaltigen Substraten erschwert sein. In diesen Fällen können die Substrate thermisch und chemisch vorbehandelt werden (Yoon et al., 2014). Für die Produktion von Cellulasen scheint eine Vorbehandlung nicht erforderlich zu sein (Brijwani & Vadlani, 2011; Cen & Xia, 1999). Trotzdem werden die meisten Substrate vor Verwendung thermisch sterilisiert (Yoon et al., 2014).

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Produktivität der Feststofffermentation. Ein wichtiger Faktor ist die Partikelgröße des Substrats, da diese das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bestimmt und die Oberfläche vorwiegend für die Mikroorganismen zugänglich ist. Zusätzlich beeinflusst die Partikelgröße des Substrats den Hohlraum, der von Luft eingenommen wird und zur effizienten Wärme- und Stoffübertragung beiträgt. Kleine Partikel haben eine größere Oberfläche für mikrobielle Aktivität, können jedoch zu Agglomerationen des Substrats führen, was die Sauerstoffversorgung beeinträchtigt. Dahingegen führt die Verwendung von größeren Partikeln zu besserer Sauerstoffversorgung, bietet jedoch im Vergleich weniger Oberfläche für die mikrobielle Aktivität. (Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

Des Weiteren hat die Wahl des Inokulums einen Einfluss auf den Prozess. Eine niedrige Inokulumkonzentration reicht möglicherweise nicht aus, um das Wachstum von Mikroben zu starten, und eine hohe Inokulumkonzentration führt zu Problemen wie einer Einschränkung des Stofftransportes. Die Feststofffermentation kann mit einer Myzel-

oder Sporenlösung gestartet werden. Um Sporen zur Inokulation zu erhalten, werden diese von der Oberfläche einer Pilzkultur mit sterilem Wasser oder Salzlösung gewaschen. Die Verwendung von Sporeninokulum bietet den Vorteil, dass die Inokulationsdichte definiert eingestellt werden kann. Allerdings ist die Gewinnung von Sporen aufwändig und die Verwendung von Sporeninokulum kann aufgrund der Keimung im Vergleich zu Myzel zu einer Prozessverzögerung führen. Daher ist die Verwendung von Myzelinokulum häufigste Methode für die Cellulaseproduktion mit Feststofffermentation. (Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014) Für eine industrielle Anwendung ist die Entwicklung einer effizienten Inokulationsstrategie essenziell.

Eine weitere Prozessvariable ist der pH, der während Feststofffermentationen normalerweise nicht kontrolliert, sondern nur zu Beginn angepasst wird. Wenn der anfängliche pH des feuchten Haufwerks angepasst wird, werden die pH-Änderungen während der Fermentation normalerweise nicht korrigiert. Jedoch haben die meisten lignocellulosehaltigen Substrate Puffereigenschaften, wodurch die Schwankungen während der Fermentation minimiert werden. Durch die Zugabe von stickstoffhaltigen anorganischen Salzen zum feuchten Haufwerk, wie beispielsweise Harnstoff, können pH-Schwankungen ebenfalls ausgeglichen werden. (Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

Die Temperatur ist ebenfalls eine wichtige Prozessvariable für die Feststofffermentation. Das Wachstum von Mikroorganismen, die Produktion von Enzymen und die Synthese von Sekundärmetaboliten sind temperaturabhängig. Die Temperatur im Bioreaktor steigt mit der Wachstumsrate und der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen. Daher sind die Schwierigkeiten beim Stofftransport und der durch die Stoffwechselwärme verursachte Temperaturanstieg die größten Herausforderungen, die in Feststofffermentationen auftreten. Wenn es keine Möglichkeit zur Ableitung der erzeugten Wärme gibt, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktbildung und das Wachstum aus. Die durch die Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen erzeugte Wärme schadet dem Wachstum und muss aus dem Bioreaktor abgeführt werden, um Wachstums- und Produktverluste aufgrund von Überhitzung zu vermeiden. Diese Herausforderung verstärkt sich bei Prozessen im großen Maßstab, da die steigende Temperatur zu einem erheblichen Feuchtigkeitsverlust führt, der das mikrobielle Wachstum stark beeinträchtigen kann. Ein starkes Erwärmen des feuchten Haufwerks führt zur Kondensation und zur Ansammlung von Wasser, was wiederum Heterogenität erzeugt. Um der Überhitzung entgegenzuwirken, muss viel Luft in den Feststoffbioreaktor geleitet werden, um die Wärme über die Gasphase abzuführen. Die

Temperatur kann dabei bis zu einem gewissen Grad durch Begasung und Umwälzung des feuchten Haufwerks kontrolliert werden. (Kumar et al., 2021)

Der Feuchtigkeitsgehalt des Substrats spielt eine entscheidende Rolle bei der Feststofffermentation. Ein optimaler Feuchtigkeitsgehalt ist für das mikrobielle Wachstum erforderlich. Ein zu niedriger Feuchtigkeitsgehalt führt zu einer verringerten Löslichkeit der Nährstoffe des Substrats, während ein zu hoher Feuchtigkeitsgehalt die Produktausbeute beeinträchtigt. Ist der Feuchtigkeitsgehalt des Substrats zu hoch, werden die Partikel von einer Wasserschicht umgeben. Dies verringert die Zwischenräume zwischen den Partikeln und kann dazu führen, dass diese aneinanderhaften, was eine verminderte Sauerstoffversorgung zur Folge haben kann. Um der Austrocknung des Substrats durch Verdunstung und dem mikrobiellen Wachstum entgegenzuwirken, erfolgt eine Begasung mit befeuchteter Luft. (Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

Zur Schaffung optimaler Bedingungen für das mikrobielle Wachstum stehen verschiedene Bioreaktortypen für die Feststofffermentation im Labormaßstab zur Verfügung. Dabei wird grundsätzlich zwischen Festbettreaktoren und bewegten Festbettbioreaktoren unterschieden. Zudem können flache Tablettbioreaktoren für die Feststofffermentation eingesetzt werden. Zu den bewegten Festbettbioreaktoren zählen der Trommelbioreaktor und gerührte Feststoffbioreaktoren (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014). Schematische Abbildungen dieser Feststoffbioreaktoren sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Die Tablettbioreaktoren sind einfach zu betreiben, da kein mechanisches Mischen erforderlich ist. Diese Reaktoren werden traditionell für die Herstellung fermentierter Lebensmittel wie Tempeh, Miso, Koji und Sojasoße eingesetzt. Die Tablett bestehen in der Regel aus Holz, Metall oder Kunststoff und sind mit oder ohne Perforation erhältlich. Sie werden mit Substrat befüllt und in temperatur- sowie feuchtigkeitskontrollierten Räumen gestapelt. (Arora et al., 2018) Die Füllhöhe des feuchten Haufwerks beträgt in der Regel zwischen 5 cm bis 15 cm (Mitchell et al., 2000). Herausforderungen bestehen in möglichen Temperaturgradienten aufgrund ineffizienter Wärmeableitung. Eine Skalierung ist lediglich durch die Vergrößerung der Oberfläche und die Erhöhung der Tablett Anzahl möglich. (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

Festbettreaktoren sind besonders für die Fermentation scherkraftempfindlicher Pilze geeignet, da die Feststoffschüttung nicht gerührt wird. Die Konstruktion des Bioreaktors besteht in der Regel aus einem zylindrischen Behälter, der zur Temperaturregelung ummantelt sein kann. Innerhalb des Feststoffbetts können auch Kühlplatten eingebaut

werden, um eine effiziente Wärmeableitung zu gewährleisten. Während der Fermentation können jedoch Herausforderungen wie Temperaturgradienten, Druckabfall oder Kanalbildung im Substrat auftreten. (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

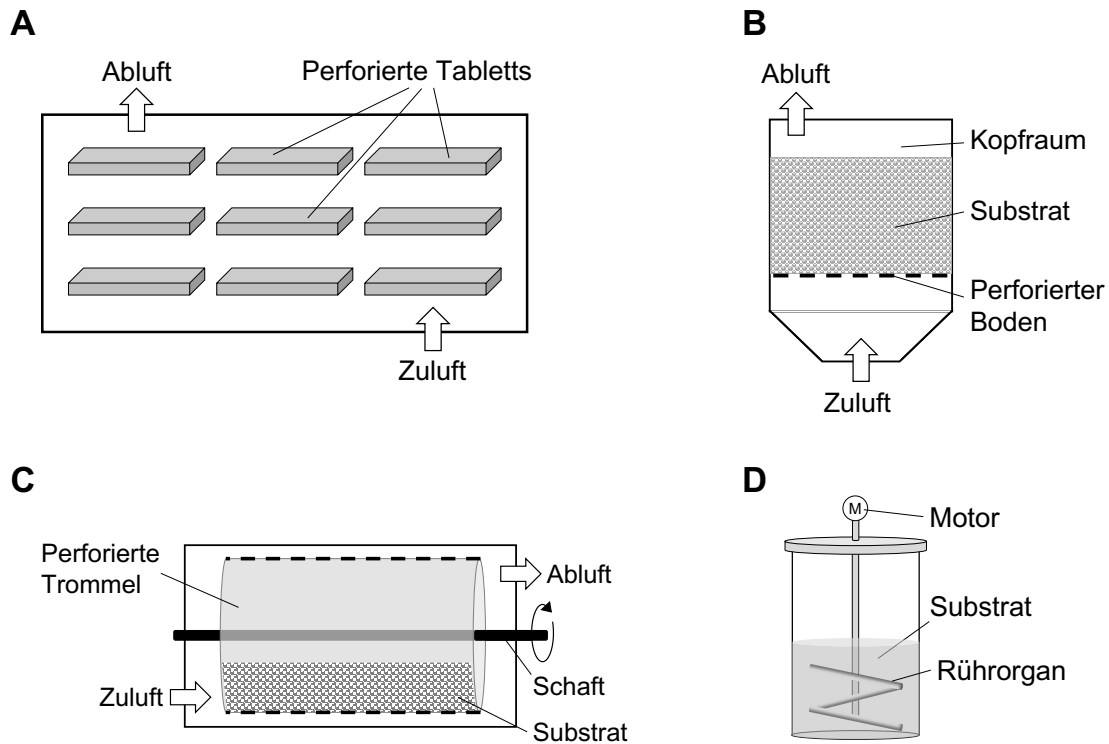


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung von für die Feststofffermentation geeigneter Bioreaktoren: (A) Tablettbioreaktoren, (B) Festbettreaktoren, (C) Trommelbioreaktor und (D) gerührte Feststoffbioreaktoren adaptiert nach Arora et al. (2018), Kneesebeck et al. (2023), Kumar et al. (2021), Yoon et al. (2014) und Zhang et al. (2010).

Durch die Rotation von Trommelbioreaktoren werden sowohl die Sauerstoffversorgung als auch die Wärmeübertragung in der Feststoffschüttung im Vergleich zu nicht bewegten Festbettreaktoren verbessert. Dieser Bioreaktortyp besteht aus einem zylindrischen Behälter, der auf einer Drehvorrichtung montiert ist und sich aus der Trommelwand, dem Kopfraum und dem Substratbett zusammensetzt. In der Regel wird Luft durch den Kopfraum über das rotierende Substratbett geleitet. Der Bioreaktor kann dabei intermittierend oder kontinuierlich gedreht werden, wobei die Durchmischung des Substratbetts durch die Drehung der Trommel erfolgt. Zur Homogenisierung des Festbetts können in der Trommel innenliegende Förderorganen oder Heber integriert werden. Zudem können Glasperlen eingesetzt werden, um eine Agglomeration des Substrates zu vermeiden. Jedoch kann das Pilzwachstum durch Scherkräfte sowie der Aggregation des Substratbetts durch Rotation beeinträchtigt werden. Trotz dieser

Herausforderungen ist dieser Bioreaktortyp grundsätzlich skalierbar. (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021; Yoon et al., 2014)

Ein Anwendungsbeispiel für kontinuierlich betriebene Trommelbioreaktoren ist die Behandlung von kommunalen Abfällen. Frisches Material wird über ein Förderband in den Trommelbioreaktor eingebracht und verbleibt zwischen sechs Stunden und drei Tagen in der Trommel. Durch die Rotation wird das feuchte Haufwerk entlang der Trommelachse vom Einlass bis zum Austrag befördert. Die Trommel hat zwischen 20 % und 30 % Luftvolumenanteil und wird typischerweise kontinuierlich betrieben, kann jedoch auch als Satzverfahren betrieben werden. Die Bewegung der Materialien wird durch die Zufuhr frischer Materialien gesteuert, die das ältere Material in der Trommel zum Austrag schieben. In einigen Fällen kann die Materialbewegung durch die Drehgeschwindigkeit der Trommel geregelt werden. Die Trommel rotiert normalerweise mit einer konstanten Geschwindigkeit von ein bis fünf Umdrehungen pro Minute, je nach der spezifischen Anlagenkonstruktion. (Gikas et al., 2018)

Auch gerührte Feststoffbioreaktoren können für die Feststofffermentation eingesetzt werden. Hier erfolgt die Homogenisierung des Haufwerks durch eingebaute Rührorgane (Knesebeck et al., 2023; Zhang et al., 2010). Die Wahl geeigneter Rührorgane ist dabei entscheidend. So haben sich helikale Rührorgane als besonders energieeffizient für hochviskose Substrate erwiesen. (Zhang et al., 2010)

Für die Skalierung dieser Bioreaktortypen sind insbesondere die Entwicklung einer geeigneter Füllmethode für die Feststoffschüttung sowie einer Inokulationsstrategie, abgestimmt auf das jeweilige Bioreaktordesign, von zentraler Bedeutung. Darüber hinaus spielt die Ernte der Produkte nach der Feststofffermentation eine wesentliche Rolle. Im Fall der Enzymproduktion können die Enzyme durch Extraktion vom Feststoff gewonnen werden, wobei Wasser, Salzlösungen oder Glycerinlösungen als Extraktionsmittel genutzt werden können (Castilho et al., 2000).

3.3. Pektinreicher Agrarreststoff Zuckerrübenpressschnitzel

In diesem Kapitel wird die Saccharoseproduktion aus Zuckerrüben beschrieben, bei der Zuckerrübenpressschnitzel als Nebenprodukt anfallen. Im Anschluss werden die Zusammensetzung der Zuckerrübenpressschnitzel sowie die enzymatische Hydrolyse zur Freisetzung ihrer Monomere, einschließlich L-Arabinose, erläutert.

3.3.1. Zuckerherstellung aus Zuckerrüben

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* Subspezies *vulgaris*) ist eine landwirtschaftliche, zweijährige Kulturpflanze, die ursprünglich wegen ihrer spinatartigen Blätter und später auch als Futterpflanze angebaut wurde. Durch intensive Züchtung wurde aus dem ursprünglich relativ kleinen Wurzelgemüse mit einem Saccharosegehalt von etwa 5 % eine Vergrößerung der Wurzel sowie eine Erhöhung des Saccharosegehalts erreicht und eine einkeimige Pflanze entwickelt. Die Zuckerrübe wird auch heute noch als Modellpflanze für die Verbesserung der Pflanzenleistung durch Gentechnik und Züchtung verwendet. Die heutigen Zuckerrübensorten erreichen innerhalb von 6 – 7 Monaten einen Saccharosegehalt von bis zu 20 % in der Rübe. Zuckerrüben können unter einer Vielzahl unterschiedlicher klimatischer Bedingungen gedeihen, wobei sie eine hohe Resistenz gegen Schädlinge, Krankheiten und sogar Herbizide aufweisen. Die Zuckerrübe wird als effektive Zwischenfrucht verwendet, die Schädlingsprobleme reduziert und den Düngerbedarf für nachfolgende Getreidekulturen senkt. Als eine der wenigen Frühlingsaussaaten bieten Zuckerrüben die Möglichkeit, die Getreidestoppeln nach der Ernte über den Winter auf dem Feld zu belassen und so eine wertvolle Nahrungsquelle für Wildtiere zu schaffen. Die Zuckerrübe setzt sich aus 75 % Wasser, 18 % Saccharose und 5 % Fasern zusammen. Im Vergleich zum Zuckerrohr, welches ebenfalls als Rohstoff für die Saccharose Produktion dient, ist der Saccharose Gehalt in Zuckerrüben um 4 % höher. (Muir & Anderson, 2021)

In Europa ist die Zuckerrübe ein wichtiges landwirtschaftliches Produkt, da sie die Hauptquelle für die Zuckerproduktion ist. Nach Angaben der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen betrug im Jahr 2022 die Produktion von Zuckerrüben 157 Millionen Tonnen pro Jahr und stellte damit das zweitgrößte landwirtschaftliche Erzeugnis dar, mit einem durchschnittlichen Ertrag von 54,4 Tonnen pro Hektar (García-Velásquez & van der Meer, 2023). Somit ist die Europäische Union der größte Erzeuger von Zuckerrüben (46 % der Weltproduktion) und bis vor kurzem die einzige Region außerhalb der USA, die begonnen hat, die Verwendung von Zuckerrüben zu diversifizieren. Im Jahr 2013 wurden etwa 13 % der europäischen Zuckerrüben für die Herstellung von Biokraftstoffen und 4 % für andere industrielle Zwecke verwendet, wobei nur 0,2 % für die Herstellung von funktionellen Chemikalien genutzt werden. (Muir & Anderson, 2021; Ragauskas et al., 2006)

Die konventionelle Herstellung von Kristallzucker aus Zuckerrüben wurde vom deutschen Chemiker Franz Carl Achard entwickelt, der im Jahr 1801 die erste Rübenzuckerfabrik in Europa errichtete (Muir & Anderson, 2021). Das derzeitige

Verfahren zur Herstellung von Rübenzucker, einschließlich der wichtigsten Nebenprodukte, ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

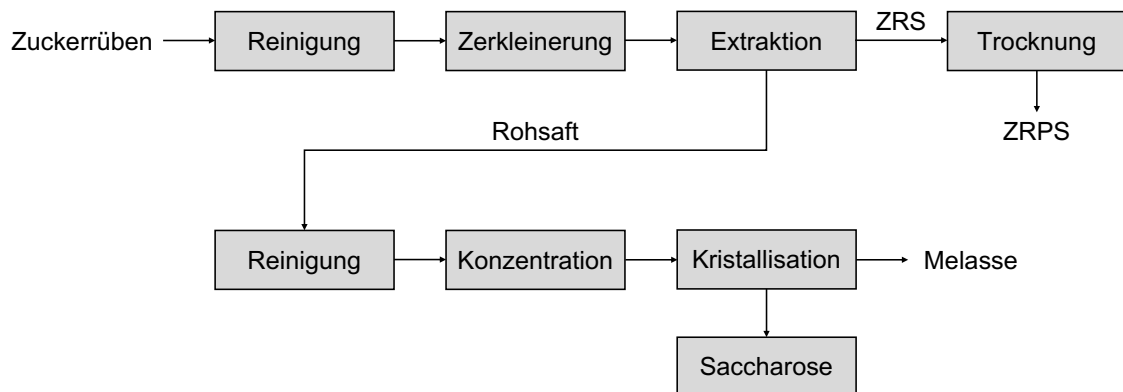


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Saccharoseproduktion aus Zuckerrüben adaptiert nach Muir und Anderson (2021). Als Nebenprodukte fallen Zuckerrübenschnitzel (ZRS) nach der Rohsaftextraktion an, die anschließend zu Zuckerrübenpressschnitzeln (ZRPS) weiterverarbeitet werden, sowie Melasse, die bei der Kristallisation von Saccharose anfällt.

Die Erntesaison für Zuckerrüben dauert in Europa in der Regel von September bis Januar. Zuckerrüben wachsen unter der Erde, weshalb nach der Ernte Erde an den Rüben haftet. Der erste Schritt nach der Ankunft und Entladung in der Zuckerfabrik ist daher die Reinigung mit Wasser sowie die mechanische Entfernung von Steinen, Unkraut und Rübenbruchstücken. Anschließend werden die Zuckerrüben in lange Streifen geschnitten, die als Schnitzel bezeichnet werden. Diese werden in einem Gegenstromextraktionsverfahren durch heißes Wasser geleitet. Durch die hohen Temperaturen öffnen sich die Zellwände der Schnitzel und die Saccharose löst sich im Wasser, wodurch zwischen 96 – 98,5 % der Saccharose als Rohsaft extrahiert werden können. (Kunz et al., 2020; Muir & Anderson, 2021)

Der gewonnene Rohsaft wird gereinigt, so dass der sogenannte Dünnsaft entsteht. Das dabei gebräuchlichste Reinigungsverfahren ist die Karbonatisierung, bei der dem Rohsaft Kalziumhydroxid zugesetzt wird. Durch die Zugabe von Kalziumhydroxid werden Verunreinigungen im Dünnsaft denaturiert, zersetzt oder fallen aus. Durch die Zugabe von Kohlenstoffdioxid fällt das überschüssige Kalzium als Kalziumkarbonat aus. Das kristallisierte Kalziumkarbonat hat eine stark adsorbierende Oberfläche, die das Absetzen und Zusammenballen der Feststoffe und Ausfällungen aus dem Reinigungsprozess erleichtert. Die Feststoffe werden dann entweder in einem Absetzbecken oder durch Filtration entfernt. Der Filterkuchen wird anschließend ausgepresst und kann dann als Düngemittel zur Verbesserung des pH und der Bodenstruktur eingesetzt werden. Er enthält einen hohen Anteil an verfügbarem Kalzium

sowie Mineralien wie Magnesium, Phosphaten und Stickstoff und eignet sich für eine Vielzahl von landwirtschaftlichen Ausbringungsmethoden. (Kunz et al., 2020; Muir & Anderson, 2021)

Der Dünnsaft wird anschließend durch mehrstufige Vakuumverdampfung von Wasser zum sogenannten Dicksaft verarbeitet. In einem letzten Schritt wird die Saccharose aus dem Dicksaft kristallisiert. Dies geschieht in der Regel in zwei oder drei kaskadierenden Kristallisationsschritten mit vollständiger Rückführung des Roh- und des Endzuckers. Der übrige Sirup wird Melasse genannt und kann als Futtermittelzusatz verwendet werden, wird jedoch meistens als Ausgangsmaterial für Fermentationsprozesse genutzt. (Kunz et al., 2020; Muir & Anderson, 2021)

Die nach der Saccharoseextraktion anfallenden Zuckerrübenschnitzel werden ausgepresst, sodass der Feuchtigkeitsgehalt bei etwa 70 % liegt. Anschließend werden die erhaltenen Zuckerrübenpressschnitzel häufig weiter getrocknet. Bei einem Feuchtigkeitsgehalt von etwa 12 % können die Pressschnitzel als Futtermittel in der Landwirtschaft eingesetzt werden. (Muir & Anderson, 2021)

3.3.2. Zusammensetzung und Verwertung von Zuckerrübenpressschnitzel

Bei der Verarbeitung von Zuckerrüben können aus einer Tonne Zuckerrüben 160 kg Zucker, 500 kg feuchte Zuckerrübenschnitzel und 38 kg Melasse gewonnen werden. Getrocknete Zuckerrübenpressschnitzel mit einem Feuchtigkeitsgehalt zwischen 8 – 3 % setzen sich aus 24 – 32 % Hemicellulose, 22 – 30 % Cellulose, 15 – 32 % Pektin, 1 – 2 % Lignin und 7 – 8 % Protein zusammen. Die Zusammensetzung der Schnitzel kann je nach dem Verfahren der Zuckergewinnung, dem Reifegrad der Wurzel und der geografischen Herkunft der Zuckerrüben variieren. Die monomere Zusammensetzung von vollständig hydrolysierten Zuckerrübenpressschnitzel beträgt 21 – 26 % D-Glukose, 14 – 21 % D-Galakturonsäure, 21 – 23 % L-Arabinose, 5 – 6 % D-Galaktose, 2,5 % L-Rhamnose, 2 % D-Xylose und 1 % D-Mannose. Zuckerrübenpressschnitzel stellen somit ein Rohstoff dar, der reich an Kohlenstoffquellen ist und daher ein großes Potential für den Einsatz in Fermentationsprozessen bieten. (García-Velásquez & van der Meer, 2023; Marzo-Gago et al., 2023)

Die Produktionskosten für entwässerte Schnitzel, die durchschnittlich 110 Euro pro Tonne betragen, sind jedoch höher als ihr derzeitiger Marktwert von 112 Euro pro Tonne als Tierfutter (García-Velásquez & van der Meer, 2023).

Es gibt unterschiedliche Anwendungen für Zuckerrübenpressschnitzel. Zum einen werden die getrockneten Schnitzel als Futtermittel in der Landwirtschaft eingesetzt, da

sie leicht verdaulich sind und einen hohen Energiegehalt für Wiederkäuer besitzen. Auch zur Produktion von Biogas finden Zuckerrübenpressschnitzel in der Landwirtschaft Anwendung. (Muir & Anderson, 2021)

Der hohe Pektingehalt ist als potenzielle Quelle für Pektin-Oligosaccharide von Interesse, die als neue Klasse von Präbiotika gesundheitsfördernde Wirkungen besitzen. Des Weiteren weist das Pektin aus Zuckerrübenpressschnitzel hervorragende Emulgierfähigkeit auf, weshalb es auch als Emulgator eingesetzt werden könnte. Außerdem wird Pektin auch in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt. Zuckerrübenpressschnitzel sind reich an Ferulasäure, einem bekannten Antioxidans. Zur Gewinnung von Antioxidantien sowie verschiedener Flavonoide aus Zuckerrübenpressschnitzel wurden verschiedene Methoden der chemischen Extraktion untersucht, wobei diese Substanzen als natürliche Aromastoffe und Konservierungsmittel in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie Verwendung finden könnten. (Bindereif et al., 2022; Devos & Colla, 2022; García-Velásquez & van der Meer, 2023; Lin et al., 2023; Marzo-Gago et al., 2023; Muir & Anderson, 2021)

Der hohe Cellulosegehalt der Zuckerrübenpressschnitzel macht sie zu einer potenziellen Quelle für biobasierte Chemikalien. Die enthaltene Cellulose kann potenziell für die Herstellung von Nanopapieren, Nanokompositionen, Aerogelen und Hydrogelen genutzt werden. Die Monomere der Hemicellulose von Zuckerrübenpressschnitzel – darunter D-Glukose, L-Arabinose, D-Galaktose, D-Xylose, L-Rhamnose und D-Mannose – finden potenzielle Anwendungen in der Lebensmittel-, Pharma- und Chemieindustrie oder können als Ausgangsmaterial für Fermentationen dienen. Ein mögliches Produkt aus den Zuckern der Hemicellulose von Zuckerrübenpressschnitzel ist Ethanol. Industriell wird zur Bioethanolherstellung vorwiegend Saccharose oder Molasse eingesetzt. Es gibt jedoch Forschungsansätze zur Nutzung von Pentosen für die Bioethanolproduktion mit Hefen. Eine Möglichkeit hierfür ist das Verfahren der parallelen Verzuckerung und Fermentation, bei dem Mikroorganismen die freigesetzten Zucker direkt zu Ethanol umsetzen. (Berłowska et al., 2016; Devos & Colla, 2022; Muir & Anderson, 2021)

Weitere Untersuchungen befassen sich mit der Herstellung von Biokunststoffen aus Zuckerrübenpressschnitzel. Dabei dienen die Pressschnitzel als potenzieller Rohstoff für die Produktion von Polymilchsäure und Polyhydroxyalkanoaten, die auf mikrobiell hergestellter Milchsäure und Hydroxyalkanoaten basieren. (García-Velásquez & van der Meer, 2023; Lin et al., 2023; Marzo-Gago et al., 2023; Muir & Anderson, 2021)

3.3.3. Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel

Es gibt verschiedene Methoden zur Verzuckerung von Zuckerrübenpressschnitzel. Dazu zählen die Hydrolyse mit Säuren oder Basen, hydrothermale Verfahren und die enzymatische Hydrolyse. Aufgrund des hohen Energieverbrauchs und der potenziellen Freisetzung wachstumsinhibierender Abbauprodukte aus ligninhaltiger Biomasse gelten chemische und thermische Verfahren als nicht nachhaltig. Obwohl die enzymatische Hydrolyse im Vergleich zu chemischen weniger effizient ist, bietet sie aufgrund der niedrigen Reaktionstemperaturen, milden pH-Bedingungen und der reduzierten Freisetzung wachstumsinhibierender Abbauprodukte eine energieeffiziente Alternative. (Chamy et al., 1994; Cherry & Fidantsef, 2003; Leijdekkers et al., 2013; Levigne et al., 2002; Micard et al., 1996; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000)

Zuckerrübenpressschnitzel bestehen aus komplexen Biomolekülen, weshalb für deren Abbau eine Vielzahl von Enzymen zur Verzuckerung notwendig sind (Semenova et al., 2019). Bei der industriellen Herstellung von Ethanol basierend auf Cellulose stellt die Produktion von Cellulasen einen erheblichen Kostenfaktor dar, weshalb die Reduzierung der Enzymkosten entscheidend für die wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit des Verfahrens ist. Filamentöse Pilze sind dabei die Hauptproduzenten von hydrolytischen Enzymen wie Cellulasen und Hemicellulasen. (Johnson, 2016; Walker & Wilson, 1991)

Celluloseabbauende Enzyme

Der enzymatische Abbau von der in den Zuckerrübenpressschnitzel vorhandenen Cellulose erfolgt mit Cellulasen in mehreren Schritten. Zuerst erfolgt der Transfer der Enzyme in der wässrigen Phase auf die Oberfläche der Cellulosepartikel. Anschließend adsorbieren die Enzyme an die Partikel und bilden ein Enzym-Substrat-Komplex bis schließlich die Cellulose hydrolysiert wird. Dann werden Cellodextrine, Cellobiose und Glukose von der Oberfläche der Cellulosepartikel in die wässrige Phase transferiert und dort anschließend die Cellodextrine und Cellobiose zu Glukose hydrolysiert. Die Adsorption von Enzymen und die Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen werden als kritische Schritte bei der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose angesehen. Diese Schritte werden durch die strukturellen Merkmale der Cellulose, die Art der Wechselwirkung zwischen den Cellulasen und der Cellulosefaser, die Art der verwendeten Cellulasen und die Anfälligkeit der Enzyme für Produkthemmung beeinflusst. Cellulosefasern enthalten sowohl amorphe als auch kristalline Bereiche. Kristalline Bereiche gelten als schwerer abbaubar im Vergleich zu den amorphen Bereichen. Durch physikalische und chemische Vorbehandlungen können kristalline

Strukturen aufgebrochen und somit leichter zugänglich für Enzyme werden. (Walker & Wilson, 1991)

Cellulasen können in drei Hauptklassen unterteilt werden: Endoglucanasen (EC 3.2.1.4), Cellobiohydrolasen (EC 3.2.1.91) und β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21). Die Endoglucanase greift zufällig entlang der Cellulosefaser an, katalysiert die Hydrolyse der β -1,4-glykosidischen Bindung und setzt somit Glukose, Cellobiose und weitere langkettige Oligomere frei. Die Cellobiohydrolase, auch als Exoglucanase bezeichnet, kann hochkristalline Cellulose abbauen und spaltet dabei Cellobiose von reduzierenden und nicht-reduzierenden Enden der Celluloseketten ab. Das Enzym β -Glucosidase hydrolysiert Cellobiose und spaltet das Molekül in zwei Glukosemonomere. (Houfani et al., 2020; Walker & Wilson, 1991) Eine schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

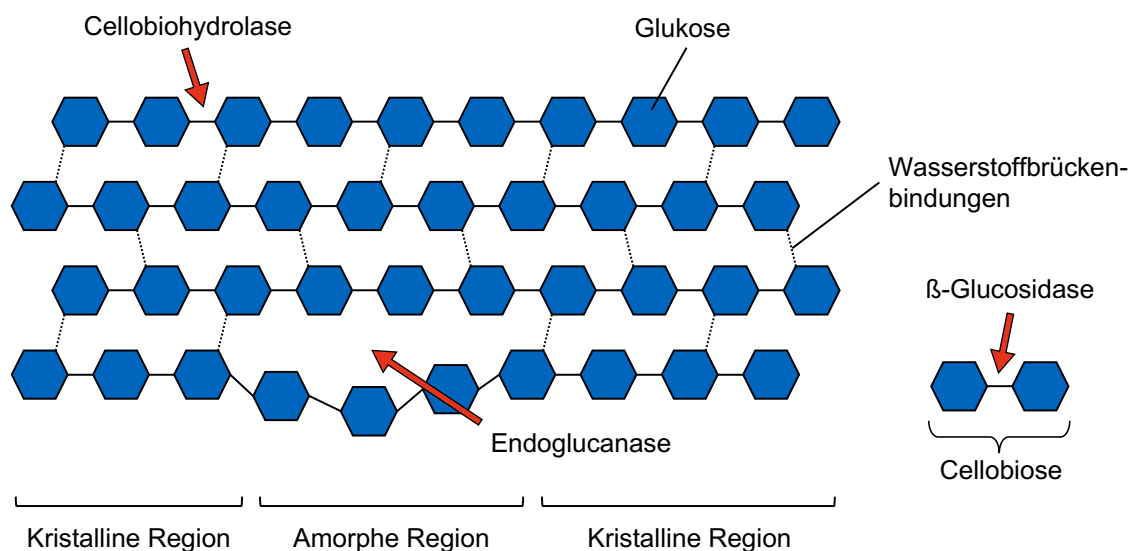


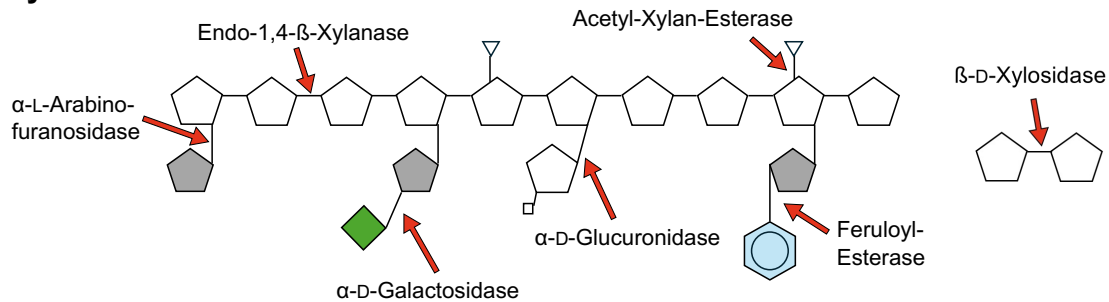
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Cellulose und der jeweiligen Angriffspunkte der Cellulasen adaptiert nach Andlar et al. (2018), Datta (2024) und Iram et al. (2022).

Hemicelluloseabbauende Enzyme

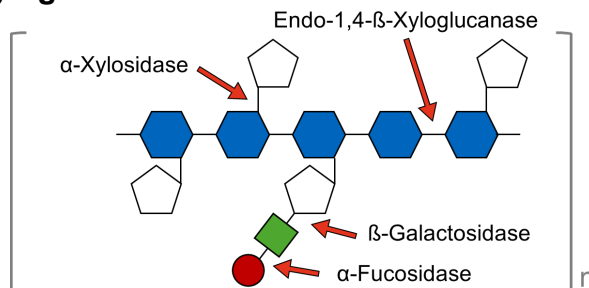
Hemicellulose ist das zweithäufigste Polysaccharid, dass in Pflanzen vorkommt. Dabei besteht Hemicellulose aus verschiedenen Polymeren, die sich aus Pentosen und Hexosen zusammensetzen. Zu den Pentosen der Hemicellulose gehören beispielsweise D-Xylose und L-Arabinose und zu den Hexosen D-Mannose, D-Glukose und D-Galactose, wobei D-Xylose der am häufigsten in Hemicellulose vorkommende Zucker ist. Darüber hinaus können auch Uronsäuren wie D-Glucuronsäure, D-Galakturonsäure und Methylgalakturonsäure in den verzweigten Ketten vorhanden sein. Die Hemicellulose-Polymere sind häufig durch kovalente und Wasserstoffbrückenbindungen miteinander

verbunden. Hemicellulose kann auch über aromatische Ester an Lignin und über Wasserstoffbrücken an Cellulose gebunden sein und so die Verbindung zwischen Cellulose und Lignin bilden. Zudem ist Hemicellulose von Natur aus hygroskopisch und hydrophil. (Houfani et al., 2020)

Xylan



Xyloglucan



Galactomannan

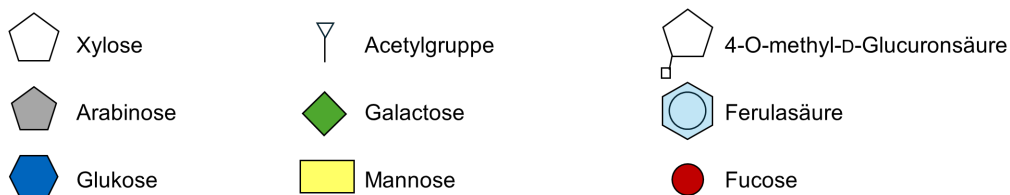
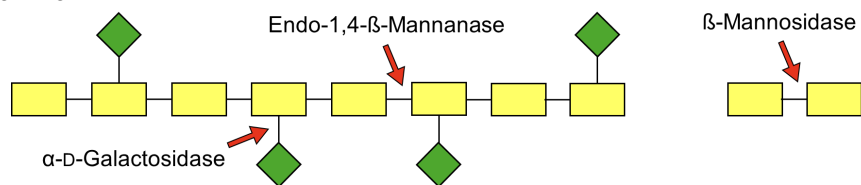


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Hemicellulose Hauptstrukturen Xylan, Xyloglucan und Galactomannan und deren enzymatischer Abbau adaptiert nach Houfani et al. (2020), Iram et al. (2022) und Matsuzawa et al. (2021).

Hemicellulosen werden nach dem Hauptzucker klassifiziert, aus dem das Polymer besteht. Ihre Hauptstrukturen sind Xylan, Xyloglucan und Galactomannan. Xylan besteht aus Xylose-Einheiten im Rückgrat, die durch β -1,4-Bindungen mit der durch L-Arabinose

substituierten Xylopyranose-Einheit verbunden sind. Dabei sind mögliche Xylopyranose Einheiten 4-O-methyl-D-Glucuronsäure-, Acetyl- oder Ferulasäure-Gruppen. Ferulasäuren können potenziell über Esterbindungen miteinander interagieren, die zwei Xylanketten verbinden oder die Bindung von Hemicellulosen mit Lignin ermöglichen. Xyloglucan besteht aus einer Kette von D-Glukose, die durch β -1,4-glykosidische Bindungen verbunden und durch D-Xylosen substituiert ist. Galactomannan besteht aus Glukose- und Mannoseeinheiten und kommt vor allem in Nadelbäumen vor. Andere Lignocellulosematerialien können ebenfalls erhebliche Mengen an Arabinogalaktanen und Galaktanen enthalten. Hemicellulose ist aufgrund der Verzweigungen der neutralen und sauren Seitengruppen nicht oder nur wenig kristallin. (Houfani et al., 2020; Rao et al., 2023) Eine schematische Darstellung der Hemicellulose Hauptstrukturen und deren enzymatischen Hydrolyse ist in Abbildung 3.8 abgebildet.

Aufgrund ihrer heterogenen Natur erfordert die vollständige Depolymerisation von Hemicellulose die synergistische Wirkung eines Spektrums an hemicellulolytischen Enzymen. Während der Hydrolyse werden durch die strukturellen Veränderungen eingeschlossene Bindungen freigelegt, wodurch sich die Zugänglichkeit ändert und neue Enzyme für die Depolymerisation der Hemicellulose angreifen können. Daher verfolgen verschiedene Mikroorganismen unterschiedliche Strategien zum Abbau der Zellwand. Filamentöse Pilze wie *Cochliobolus carbonum*, *Aspergillus*-Spezies und *Trichoderma*-Spezies sekretieren alle Hemicellulasen gleichzeitig. Diese Enzyme wirken synergetisch, um das Hemicellulosepolymer in Monomere oder Oligomere zu depolymerisieren. Dahingegen gibt es aerobe Mikroorganismen wie *Bacillus stearothermophilus*, die Hemicellulose in zwei Schritten hydrolysiert. Zuerst findet die Hydrolyse des Polysaccharid-Grundgerüsts in große Oligomere statt, und anschließend werden Enzyme zur Hydrolyse der Oligomere in deren Monomere sekretiert. Es wurden auch schon anaerobe Mikroorganismen wie *Clostridium thermocellum* beschrieben, die Multienzymkomplexe zum Abbau von Hemicellulose besitzen. Hemicellulasen bestehen in der Regel aus einer oder mehreren katalytischen Domänen und einer Vielzahl von zusätzlichen nicht-katalytischen Domänen, wie beispielsweise der Kohlenhydratbindungsdomäne. Bei der katalytischen Domäne dieser Enzyme handelt es sich entweder um eine Glycosidase, die glykosidische Bindungen hydrolysiert, oder um eine Kohlenhydratesterase, die Esterbindungen zwischen Xylan und den Seitenketten Phenol-, Methyl-, Acetyl- und Phenolester abspaltet, so dass die Glycosidase anschließend wirken kann. Zu den Enzymunterklassen der Glycosidase gehören Xylanasen, Mannasen, Arabinofuranosidasen und Glucuronidasen. An der Hydrolyse von Esterbindungen sind die Enzyme Acetyl-Xylan-Esterase und Feruloyl-

Esterase der Enzymunterklasse Kohlenhydraterase beteiligt. (Houfani et al., 2020; Juturu & Wu, 2013)

Pektinabbauende Enzyme

Pektine sind natürliche Kohlenhydrate, die als eine Mischung von Heteropolysacchariden definiert sind, die hauptsächlich in den mittleren Lamellen und primären Zellwänden von Pflanzen vorkommen. Sie können aus verschiedenen miteinander verbundenen Strukturelementen bestehen, wie Homogalakturonan, Xylogalakturonan, Rhamnogalakturonan Typ I und Rhamnogalakturonan Typ II. (Schmitz et al., 2019)

Das vorherrschende Merkmal von Pektin ist eine lineare Kette von α -1,4-verknüpfter α -D-Galakturonsäure. Dieses Rückgrat ist zu 2 – 4 % mit L-Rhamnose über β -1,2- und β -1,4-Verknüpfungen verbunden. Die Arabinan-, Galaktan-, Arabinogalaktan-, Xylose- oder Fucose-Seitenketten sind über ihre C₁- und C₂-Atome mit der Hauptkette verbunden. Da Pektin in verschiedenen Formen in den Pflanzenzellen vorhanden sein kann, gibt es verschiedene pektinolytische Enzyme. (Combo et al., 2013; Jayani et al., 2005)

Die pektinolytischen Enzyme lassen sich in drei größere Gruppen unterteilen: die Protopektinasen, Esterasen und Depolymerasen. Die Protopektinasen bauen das unlösliche Protopektin ab und lassen hochpolymerisiertes lösliches Pektin entstehen. Esterasen katalysieren die Abspaltung von Methoxyestern von Pektin. Depolymerasen katalysieren die hydrolytische Spaltung der α -1,4-Glykosidverbindungen des D-Galakturonsäurerückgrats in Pektin. Die Depolymerasen wirken durch zwei verschiedene Mechanismen, nämlich durch Hydrolyse bei Vorhandensein von Wasser und durch Eliminierungsreaktion, bei der sie die glykosidische Bindung ohne Beteiligung eines Wassermoleküls brechen. Depolymerasen zum Abbau von Homogalakturonan können in vier verschiedene Kategorien unterteilt werden, je nach Substrat, Mechanismus der Spaltung und der Aufspaltung der glykosidischen Bindungen. Die Enzyme Polygalacturonase und Polymethylgalacturonase spalten Polygalakturonsäure und Pektin hydrolytisch. Die Polygalacturonat-Lyase und Polymethylgalacturonat-Lyase hingegen bauen Polygalakturonsäure und Pektin durch β -Eliminierung ab. Je nach Angriffsort, das bedeutet zufällig oder terminal, werden diese Enzyme als Endo-beziehungsweise Exo-Enzyme bezeichnet. Für den Abbau von Xylogalakturonan ist zudem das Enzym Endoxylogalacturonanhydrolase beteiligt. (Bonnin & Pelloux, 2020; Glass et al., 2013; Jayani et al., 2005)

Am enzymatischen Abbau der Pektinstruktur Rhamnogalakturonan I sind zahlreiche Enzyme synergistisch beteiligt. Die Degradation des Rückgrats wird durch Endo-Enzyme wie Rhamnogalakturonanhydrolyase oder Rhamnogalakturonanlyase katalysiert. Zudem gibt es Exo-Enzyme, die den Abbau an den terminalen Enden der Polymerstruktur katalysieren, darunter Rhamnohydrolasen und Galacturonhydrolasen. Die Seitenketten der Struktur werden von Arabinasen und Galactasen abgebaut. Darüber hinaus sind weitere Enzyme wie Arabinosidasen, α -Arabinofuranosidasen, α - und β -Galactosidasen sowie β -Glucuronidasen an diesem Prozess beteiligt. (Glass et al., 2013; Silva et al., 2016)

Über die Enzyme, die am Abbau der Pektinstruktur Rhamnogalakturonan II beteiligt sind, ist bislang wenig bekannt. Es liegt jedoch nahe, dass die für Rhamnogalakturonan I beschriebenen Enzyme ebenfalls eine Rolle spielen könnten. (Bauer et al., 2006; Wong, 2008)

Eine schematische Darstellung von Pektin und dem enzymatischen Abbau ist in Abbildung 3.9 zu finden.

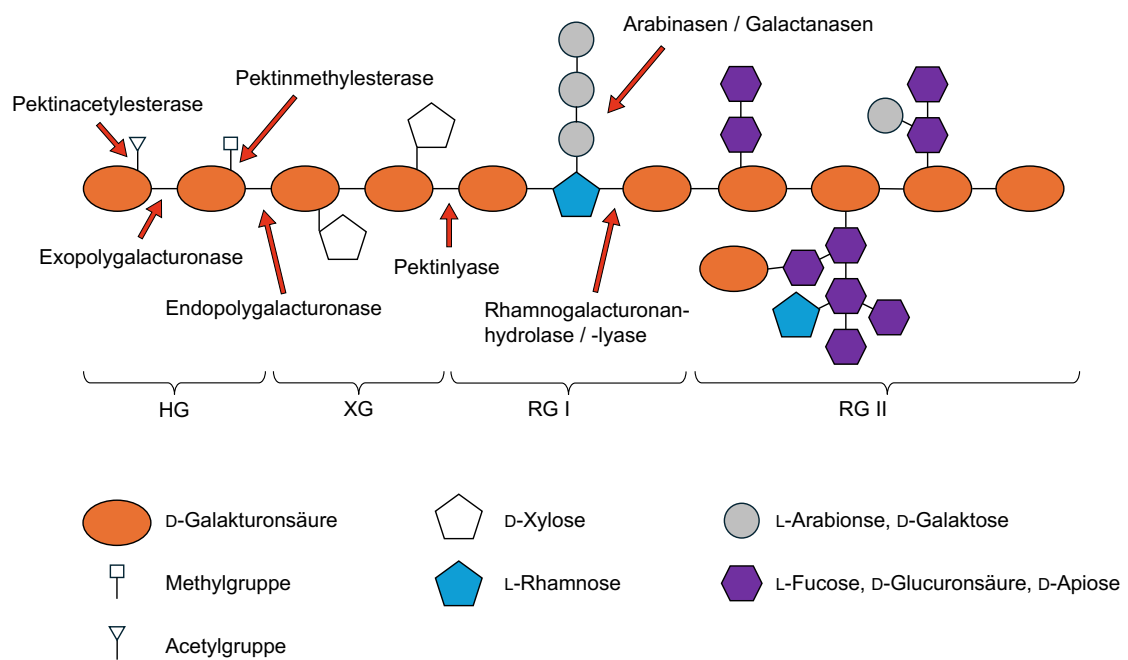


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von Pektin mit den Strukturelementen Homogalakturonan (HG), Xylogalakturonan (XG), Rhamnogalakturonan Typ I (RG I) und Rhamnogalakturonan Typ II (RG II) und der enzymatischer Abbau von Pektin adaptiert nach Glass et al. (2013), Schmitz et al. (2019) und Silva et al. (2016).

Trotz des geringen Ligningehalts ist eine Vorbehandlung von Zuckerrübenpressschnitzel aufgrund der physikochemischen Eigenschaften förderlich, um die anschließende enzymatische Hydrolyse zu verbessern. Es ist bekannt, dass die Vorbehandlung die

Struktur der lignocellulosehaltigen Biomasse verändert und ihre Zugänglichkeit für hydrolytische Enzyme erhöht. Übliche Methoden sind physikalische, chemische, kombinierte physio-chemische und biologische Vorbehandlungen von Zuckerrübenpressschnitzel. Physikalische Methoden sind die Verwendung von Ultraschall, induziertem magnetischen Feld, hohe Temperaturen und mechanisches Zerkleinern der Zuckerrübenpressschnitzel. Chemisch kann durch den Einsatz von Säuren, Basen und organischen Lösemitteln die Struktur der Zuckerrübenpressschnitzel aufgebrochen werden. Der Einsatz von Ammoniak erwies sich als vielversprechend, da damit Esterbindungen zwischen Lignin und Kohlenhydraten gespalten werden und somit der kristalline Bereich der Cellulose freigelegt wird. Oft werden auch hohe Temperaturen mit Säuren oder Basen kombiniert. Die alkalische thermische Vorbehandlung von Zuckerrübenpressschnitzel, insbesondere mit Kaliumhydroxid, hat sich als wirksam für die Zersetzung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin erwiesen. Biologisch kann mit Enzymen oder Bakterien vorbehandelt werden. (Puligundla & Mok, 2021)

Zuckerausbeuten, die durch enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel mit einer Multienzymkombination aus pilzlichen Cellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen erreicht wurden lagen bei 61 – 68 % Gesamtzucker. Davon wurden 94 % L-Arabinose und 63 – 79 % D-Glukoseausbeuten erreicht (Semenova et al., 2019). Eine weitere mit Schwefelsäure vorbehandelte enzymatische Hydrolyse setzte dahingegen 68,5 % D-Galakturonsäure und 81,9 % D-Glukose frei. Durch die Vorbehandlung wurden 71,3 % L-Arabinose freigesetzt. (Glaser et al., 2022)

3.4. D-Xylitol

D-Xylitol ist eine Pentose ($C_5H_{12}O_5$), die zu den Zuckeralkoholen und den Polyolverbindungen gehört (Mathur et al., 2023). Die Struktur von D-Xylitol ist in Abbildung 3.10 dargestellt. D-Xylitol wurde erstmals im Jahr 1890 als Sirup aus Buchenholz isoliert. Entdeckt wurde es von dem Wissenschaftler Emil Fischer, der 1902 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Das Interesse an der Kommerzialisierung von D-Xylitol als Süßungsmittel wuchs aufgrund der Zuckerknappheit während des Zweiten Weltkriegs. Als Rohstoff wurde Birkenholz verwendet, weshalb er oft als „Birkenzucker“ bezeichnet wird, obwohl er aus jeder xylosereichen Quelle gewonnen werden kann. (Delgado Arcaño et al., 2020)

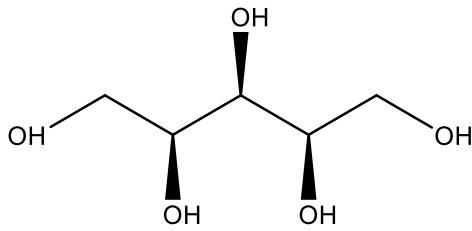


Abbildung 3.10: Struktur von D-Xylitol.

D-Xylitol weist eine ähnliche Süße wie Saccharose auf und wird daher in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Zudem findet D-Xylitol Anwendung in der Kieferorthopädie und Pharmazie, da es Zahnkaries vorbeugen kann (Mathur et al., 2023). Es steigert außerdem die Speichelproduktion und kann somit Mundtrockenheit lindern (Nwinyi & Kalu, 2021). Darüber hinaus wird D-Xylitol in einigen Medikamenten eingesetzt, um den medizinischen Geschmack bestimmter Präparate zu überdecken (Delgado Arcaño et al., 2020). Neuere klinische Studien legen nahe, dass D-Xylitol mit dem Auftreten von MACE (englisch: *major adverse cardiac event*), also schweren kardiovaskulären Ereignissen, assoziiert sein könnte. Zudem könnte die Einnahme von D-Xylitol die Thrombozytenreaktivität und auch das Thrombosepotential *in vivo* erhöhen. Weitere Studien zur Untersuchung der kardiovaskulären Sicherheit sind jedoch erforderlich. (Witkowski et al., 2024)

Die Produktion von D-Xylitol wurde in vier Jahrzehnten um mehr als den Faktor 40 gesteigert. 1978 wurden D-Xylitol und D-Mannitol mit einer weltweiten Gesamtmenge von 6.000 Tonnen produziert. Im Jahr 2016 wurde der weltweite Markt für D-Xylitol auf 190.900 Tonnen geschätzt, was einem Wert von 725,9 Millionen US-Dollar entspricht. (Delgado Arcaño et al., 2020)

D-Xylitol wird ausschließlich aus Biomasse gewonnen und es gibt keinen petrochemischen Alternativweg. D-Xylitol kann durch verschiedene Umwandlungsprozesse auch zu Propylenglykol, Ethylenglykol, Glycerin, Xylarsäure, Milchsäure und einer Mischung aus Hydroxyfuranen umgesetzt werden. (Delgado Arcaño et al., 2020; Mathur et al., 2023)

Die industrielle chemische Herstellung von D-Xylitol umfasst vier Schritte:

- (1) Gewinnung von D-Xylose aus Biomasse durch saure Hydrolyse
- (2) Reinigung des Hydrolysats zur Entfernung von Verunreinigungen wie Lignin, Hemicellulose und anderen Monosacchariden
- (3) Katalytische Hydrierung von D-Xylose zu D-Xylitol

(4) Isolation und Kristallisation von D-Xylitol

Dieser Prozess ist mit einem hohen Energieverbrauch verbunden, was zu hohen Preisen für das Endprodukt führt. In Finnland wurde dieser Ansatz in den 1970er Jahren erstmals in industriellem Maßstab angewandt, wobei pflanzliche Biomasse wie Maiskolben, Birkenholz und andere Rohstoffe verwendet wurden. (Delgado Arcaño et al., 2020; Mathur et al., 2023)

Die biotechnologische Produktion von D-Xylitol umfasst ebenfalls vier Produktionsschritte:

- (1) Gewinnung von D-Xylose aus Biomasse durch saure Hydrolyse
- (2) Reinigung des Hydrolysats zur Entfernung von wachstumsinhibierenden Abbauprodukten wie Furfural, Hydroxymethylfurfural und Essigsäure
- (3) Mikrobielle Fermentation zur Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylitol
- (4) Isolation und Kristallisation von D-Xylitol

Für diese Biotransformation werden häufig gentechnisch modifizierte Mikroorganismen eingesetzt, hauptsächlich Hefen, aber auch Pilze und Bakterien können dafür verwendet werden. Eine industrielle biotechnologische Produktion von D-Xylitol ist jedoch bislang nicht etabliert, so dass weitere Forschung und Prozessoptimierung erforderlich sind. (Mathur et al., 2023; Queiroz et al., 2022)

4. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden sämtliche Methoden beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. Zunächst werden die genetischen Modifikationen der verwendeten *Aspergillus niger* (*A. niger*)-Stämme beschrieben. Anschließend werden die Herstellung und die Verwendung der Reaktionsmedien, Substrate und Puffer erläutert. Danach wird auf die Kultivierungsmethoden von *A. niger* sowie die enzymatische Hydrolyse der Zuckerrübenpressschnitzel eingegangen. Abschließend werden die analytischen Methoden beschrieben. Im Anhang sind die dabei verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte gelistet (Kapitel 10).

4.1. Mikroorganismus *Aspergillus niger*

Für die Prozesse zur Enzym- und D-Xylitolproduktion wurden Mutanten basierend auf verschiedenen *A. niger*-Stämmen verwendet. In Tabelle 4.1 sind alle *A. niger*-Stämme mit ihren Modifikationen zusammengefasst. Alle Stämme besitzen eine Uridin-Auxotrophie. Die Stämme wurden vom Kooperationspartner an der Technischen Universität München, Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft, bereitgestellt. Der *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ -Stamm wurde ausschließlich für die hydrolytische Enzymproduktion genutzt und alle weiteren Stämme für die D-Xylitolproduktion.

Tabelle 4.1: Genetische Besonderheiten und Eigenschaften der bereitgestellten *A. niger*-Stämme. Die genetische Modifikation der Stämme zur D-Xylitolproduktion sind in Rüllke, Schönrock et al. (2024) beschrieben.

<i>A. niger</i> -Stamm	Angestrebte Eigenschaften
ATCC 11414 $\Delta gaaX$	Konstitutive Aktivierung der Pektinase-Produktion durch deletierten Repressor GaaX
NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$	Deletion der genannten Enzyme zur D-Xylitol Akkumulierung
NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$, <i>PtvdA-FPS1_{open}</i>	Deletion der genannten Enzyme zur D-Xylitol Akkumulierung und Integration des Fps1 konstitutiv geöffneten Transporters mit <i>PtvdA</i> Promoter zum D-Xylitol Export

4.2. Reaktionsmedien, Substrate und Puffer

4.2.1. Vorkulturmedium

Zur Produktion von *A. niger*-Sporen wurde die Anzucht auf Kartoffelextrakt-Glukose-Agarplatten (PDAYET) durchgeführt. Für die Herstellung der Platten wurden die in Tabelle 4.2 gelisteten Chemikalien verwendet. Für die Herstellung von 1 L PDAYET wurden die hitzekompatiblen Komponenten Kartoffelextrakt-Glukose-Agar und Hefeextrakt in vollentsalztem (VE) Wasser gelöst und bei 121 °C für 20 min hitzesterilisiert. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurden die zuvor angesetzte und sterile Spurenelementlösung (Tabelle 4.3) sowie Uridin hinzugefügt. Danach wurde das Medium in sterile Petrischalen (10 cm Durchmesser) gegossen und bis zur Verwendung maximal drei Wochen bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der PDAYET-Agarplatten.

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

4.2.2. Spurenelementlösung

Die zur Kultivierung benötigte Spurenelementlösung besteht aus verschiedenen Komponenten nach Vishniac & Santer (1957), die in Tabelle 4.3 gelistet sind. Die Stammlösung wurde 1000-fach konzentriert hergestellt, und dafür wurden die Komponenten zunächst in VE-Wasser gelöst. Anschließend wurde die Stammlösung auf pH 4 mit 2 M HCl eingestellt und bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Innerhalb der ersten zwei Wochen war ein Farbumschlag von Grün nach Lila zu beobachten. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C bis zur Verwendung.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der 1000-fach konzentrierten Spurenelementlösung nach Vishniac und 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)

Zum Ernten und Verdünnen der hydrophoben Sporen wurde eine sterile 8,9 % (w/v) Natriumchlorid- und 0,05 % (w/v) Tween[®] 80-Lösung verwendet. Dazu wurden die beiden Komponenten in Tabelle 4.4 in VE-Wasser gelöst und bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Bis zur Verwendung wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.4: 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)

Zum Durchführen von enzymatischen Aktivitätstests und zum Puffern des pH bei Feststofffermentationen wurde ein 100 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 4,5) verwendet. Um den pH einzustellen, wurde mit einer 100 mM Citronensäure-Lösung titriert, und der Puffer anschließend bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Bis zur Verwendung wurde der Puffer bei 4 °C gelagert.

4.2.5. Zuckerrübenpressschnitzel

Die in der Arbeit verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel wurden von der Südzucker AG (Mannheim, Deutschland) bereitgestellt, mit dem Etikett „26.03.2018, 201720217“. Die Zuckerrübenpressschnitzel wurden bei 4 °C gelagert und vor Verwendung für mindestens 48 h bei 50 °C getrocknet.

Die Partikelgrößenverteilung wurde mit Siebungen verschiedener Maschengrößen in Triplikaten durchgeführt. Dafür wurden jeweils 15 g getrockneter Zuckerrübenpressschnitzel für 30 s gesiebt, und zur Auswertung wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Einzelfraktionen berechnet. Die Partikelgrößenverteilung kann man der Tabelle 4.5 entnehmen.

Tabelle 4.5: Partikelgrößenverteilung von getrockneten Zuckerrübenpressschnitzeln.

Partikelgröße x, mm	Fraktioneller Anteil, %	Standardabweichung, %
4,0 < x < 6,3	10,48	3,71
2,0 < x < 4,0	62,76	2,43
0.5 < x < 2,0	26,76	1,74

Zudem wurden von der Südzucker AG (Mannheim, Deutschland) bereits gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel bereitgestellt. Die Analyse dieser Partikelgrößenverteilung befindet sich in Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Partikelgrößenverteilung von gemahlene und getrockneten Zuckerrübenpressschnitzeln.

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

Die Monomere Zusammensetzung der Zuckerrübenpressschnitzel nach Knesebeck et al. (2023) ist in Tabelle 4.7 aufgelistet.

Tabelle 4.7: Monomere Zusammensetzung der Zuckerrübenpressschnitzel nach Knesebeck et al. (2023).

Glu	D-GalA	Ara	Gal	Xyl	Man	Rha	Fuc	GluA	RM
13,6	21,8	21,6	6,9	1,2	0,5	6,8	0,2	0,3	28,5

* RM = Restmasse; (D-Glukose (Glu), D-Galakturonsäure (D-GalA), L-Arabinose (Ara), D-Galaktose (Gal), D-Xylose (Xyl), D-Mannose (Man), L-Rhamnose (Rha), D-Fucose (Fuc), D-Glucuronsäure (GluA))

4.2.6. Substrat zur Feststofffermentation

Zur Feststofffermentation von *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ zur hydrolytischen Enzymproduktion wurde ein feuchtes Haufwerk eingesetzt. Dazu wurden zunächst 80 g Zuckerrübenpressschnitzel mit 200 mL Natriumcitrat Puffer (100 mM, pH 4,5) autoklaviert und anschließend 85 mL Zusätze steril hinzugegeben. Die finalen Konzentrationen der Zusätze in der Flüssigphase des Substrats sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Für die Herstellung dieser Zusätze wurden Stammlösungen vorbereitet und steril vereinigt. Die Stammlösungen wurden separat mit VE-Wasser hergestellt, falls nötig mit Kaliumhydroxid oder Schwefelsäure titriert und anschließend bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen 2187,5 mM Ammoniumsulfat (pH 5,5), die beiden Salze 350 mM Kaliumchlorid (pH 5,5) und 550 mM Kaliumhydrogenphosphat (pH 5,5), 1 M Magnesiumsulfat und 100 mM Uridin. Bis zur Verwendung wurden die Stammlösungen bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das vorbereitete Medium mit Sporen gemischt und in einer Sterilwerkbank (SWB Klasse 1 FAZ 3, WALDNER Holding SE & Co. KG, Wangen, Deutschland) über eine Öffnung im Deckel in den zuvor sterilisierten Feststoffbioreaktor transferiert.

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Zusätze für die Feststofffermentation von *A. niger*.

Komponente			Finale Konzentration	
Stickstoffquelle	Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	307	mM
Salze	Kaliumchlorid	KCl	12,3	mM
	Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	19,3	mM
	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	3,5	mM
Uridin			1,8	mM
Spurenelementlösung (1000x)			1	mL L ⁻¹

4.2.7. Synthetisches Medium zur Kultivierung modifizierter D-Xylitol-produzierender Stämme

Zur Fermentation der D-Xylitol-produzierenden *A. niger*-Stämme wurde ein synthetisches Medium mit D-Glukose als Kohlenstoffquelle und L-Arabinose als Edukt verwendet. Es wurden außerdem für das Wachstum erforderliche Zusätze als Stammlösung vorbereitet (siehe Kapitel 4.2.6) und unter sterilen Bedingungen zusammengeführt. Die finalen Konzentrationen dieser Zusätze sind Tabelle 4.9 zu entnehmen. Abweichungen in den D-Glukose- und L-Arabinosekonzentrationen im Medium werden im jeweiligen Kapitel im Ergebnisteil spezifiziert.

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des synthetischen Mediums für die Kultivierung der *A. niger*-Stämme zur D-Xylitolproduktion.

Komponente			Finale Konzentration	
Kohlenstoffquelle	D-Glukose		7,5	g L ⁻¹
Edukt	L-Arabinose		10	g L ⁻¹
Stickstoffquelle	Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	175	mM
Salze	Kaliumchlorid	KCl	7	mM
	Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	11	mM
	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	2	mM
Uridin			1	mM
Spurenelementlösung (1000x)			1	mL L ⁻¹
Antischaummittel	Polypropylenglycol P2000		1	mL L ⁻¹

4.2.8. Medium mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat

Für die Fermentation der D-Xylitol-produzierenden Stämme wurde zudem ein Komplexmedium mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat verwendet. Das Hydrolysat wurde auf die gewünschte Konzentration von D-Glukose und L-Arabinose mit VE-Wasser und den zum Wachstum benötigten Zusätzen zu einer finalen Konzentration, wie in Tabelle 4.10 angegeben, verdünnt. Das Medium beinhaltete 600 mL Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat, 93 mL Zusätze und wurde mit 7 mL Sporenlösung inokuliert. Vor der Verwendung des Zuckerrübenpressschnitzel-

Hydrolysat-Mediums für die Kultivierung im Bioreaktor wurden 1584 mL Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für 5 min mit 140 g dampfaktivierten Aktivkohlepulver versetzt. Anschließend wurde das Hydrolysat für 20 min bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand über zwei Schritte mit zuerst 11 µm und anschließend 2,7 µm (Whatman™ Filterpapier Grad 1 und 5, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) filtriert. Im letzten Schritt wurde das Hydrolysat sterilfiltriert (Steritop® PES-Membran, 0,22 µm, 45 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Komplexmediums mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für die Kultivierung der *A. niger*-Stämme zur D-Xylitolproduktion.

Komponente			Finale Konzentration	
Kohlenstoffquelle	Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat		857,1	mL L ⁻¹
Stickstoffquelle	Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	175	mM
Salze	Kaliumchlorid	KCl	7	mM
	Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	11	mM
	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	2	mM
Uridin			1	mM
Spurenelementlösung (1000x)			1	mL L ⁻¹
Antischaummittel	Polypropylenglycol P2000		1	mL L ⁻¹

4.2.9. Substrat für Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse

Für die Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel wurden, falls nicht anders im Ergebnisteil beschrieben, 220 g gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel mit 200 mL Wasser bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Anschließend wurde dieses Substrat über eine Öffnung im Bioreaktordeckel während des Prozesses nicht steril hinzugefügt.

4.3. Kultivierung von *A. niger*

4.3.1. Stammhaltung

Die Stammhaltung der verschiedenen *A. niger*-Stämme erfolgte mit einer in 30 % (v/v) Glycerin gelösten Glyceringefrierkultur der Pilzsporenlösung bei -80 °C in 1,5 mL sterilen Reaktionsgefäßen. Dazu wurden zunächst die Sporen auf Kartoffeleextrakt-Glukose-Agarplatten (Kapitel 4.2.1) für fünf Tage bei 30 °C in einem Brutschrank (Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland) inkubiert, bis genug Sporen gebildet wurden.

Diese Pilzsporen wurden anschließend, durch Pipettieren von etwa 8 mL NaCl-Tween-Lösung auf die Platte und das Lösen der Sporen mit einem sterilen Spatel, geerntet. Die so erhaltene Sporenlösung wurde über einen sterilen Wattefilter filtriert und danach bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert (Rotana 460 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 10 mL frischer NaCl-Tween-Lösung suspendiert.

Für die Herstellung neuer Pilzsporen-Gefrierkulturen wurden nur Sporen der ersten Generation verwendet, um den Einfluss von Sporenanzucht und Generationenanzahl zu minimieren. Für die Herstellung von Vorkulturen wurden nur Gefrierkulturen der zweiten Generation verwendet.

4.3.2. Herstellung der Vorkultursporenlösung

Zur Herstellung einer Sporenlösung zur Inokulation von Prozessen wurde zuerst aus einer Glyceringefrierkultur des jeweiligen Stammes 15 µL auf eine Kartoffeleextrakt-Glukose-Agarplatte (Kapitel 4.2.1) pipettiert und anschließend für 96 h bei 30 °C in einem Brutschrank (Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland) inkubiert.

Nachdem die Platten vollständig mit Sporen bedeckt waren, wurde jeweils etwa 8 mL einer NaCl-Tween-Lösung (Kapitel 4.2.3) auf die Platten pipettiert, die Sporen mit einem sterilen Spatel gelöst und mit einem sterilen Wattefilter filtriert. Die Suspension wurde anschließend für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet mit frischer NaCl-Tween-Lösung suspendiert.

Demnach wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) hergestellt und bei 620 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Multiscan™ FC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) die Extinktion bestimmt. Damit konnte über eine zuvor ermittelte Korrelation zwischen OD₆₂₀

und Sporenkonzentration die Konzentration in der hergestellten Vorkultursporenlösung berechnet werden. Für die Korrelation wurden verschiedene Verdünnungen von Sporenlösungen hergestellt, mit einer Thoma-Zählkammer ausgezählt und zudem deren OD₆₂₀ gemessen.

Abschließend wurde das Inokulum zur benötigten Konzentration für die Feststofffermentation von $1,58 \times 10^{11}$ Sporen L⁻¹ mit NaCl-Tween verdünnt. Für die Inokulation von Bioreaktoren für die Submerskultivierungen wurde die Sporenlösung auf die benötigte Konzentration von 1×10^{11} Sporen L⁻¹ verdünnt, und das benötigte Volumen der Sporenlösung in eine sterile Spritze aufgezogen. Beide vorbereiteten Sporenlösungen wurden bis zur Inokulation bei 4 °C gelagert.

4.3.3. Vorkulturherstellung in Schüttelkolben

Die Vorkultur der Submerskultivierungen im 7,5 L-Maßstab (Kapitel 4.3.6) erfolgte in schikanenlosen 1 L-Schüttelkolben mit 100 mL synthetischem Medium (Kapitel 4.2.7) jedoch nur mit D-Glukose als Kohlenstoffquelle und ohne das Edukt L-Arabinose. Das Medium in den Schüttelkolben wurde mit jeweils 50 µL aus einer Glyceringefrierkultur (Kapitel 4.3.1) beimpft und für 96 h bei 30 °C und 180 min⁻¹ inkubiert. Anschließend wurde mit 1 % des Arbeitsvolumens im Bioreaktor inokuliert.

4.3.4. Kultivierung von *A. niger* mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat in Schüttelkolben

Für die Kultivierung des *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$, *PtdA-FPS1*_{open}-Stammes mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat in schikanenlosen 250 mL-Schüttelkolben wurden zunächst 80 mL Hydrolysat bei 4 °C für 10 min bei 14.025 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand wurde für die Kultivierung verwendet. Anschließend wurden jeweils 5,65 mL der vorbereiteten Zusätze (siehe Kapitel 4.2.8) zu 44,35 mL des zentrifugierten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats gegeben. Die Schüttelkolben wurden mit 40 µL Sporenlösung inokuliert und bei 30 °C und 180 min⁻¹ inkubiert.

4.3.5. Integrierte Feststofffermentation und Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel im Liter-Maßstab

Die integrierten Satzverfahren zur Herstellung der hydrolytischen Enzyme mittels Feststofffermentation und anschließender Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel wurden in einem Rührkesselreaktor (Labfors 5 für feststoffhaltige und enzymatische Prozesse, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) im 3,6-L-Maßstab durchgeführt.

Feststofffermentation von *A. niger* mit Zuckerrübenpressschnitzel

Die Satzkultivierungen im 3,6-L-Maßstab für die Feststofffermentation wurden in einem Glasreaktor mit flachem Boden (Labfors 5, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit den Abmessungen 15 cm Durchmesser und 22 cm Höhe und einem Doppelmantel zur Temperaturkontrolle während der Prozesse durchgeführt. Die Software eve® (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) wurde zur Steuerung und Regelung der Prozessgrößen verwendet. Alle zugehörigen Anlagenbestandteile sind Tabelle 10.3 im Anhang zu entnehmen. Der Aufbau des Rührkesselreaktors ist in Abbildung 4.2 dargestellt. In der Deckelplatte des Bioreaktors ist ein Rührmotor über eine Kupplung mit Gleitringdichtung an der Rührwelle angeschlossen.

Außerdem sind in der Deckelplatte Stutzen für Titrationsmittel, ein Tauchrohr mit Temperaturfühler, ein Probenahmerohr, eine pH-Sonde, ein Begasungsrohr und ein Abluftkühler zur Minimierung der Verdunstung montiert. Zur Homogenisierung während der Hydrolyse wurden an der Rührwelle von unten nach oben ein Ankerrührer (14 cm Durchmesser), ein Einfachhelixrührer (14 cm Durchmesser) und ein Schrägblattrührer (45°, 7 cm Durchmesser) montiert. Diese Rührer (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Der Ankerrührer wurde am unteren Ende der Rührwelle montiert und direkt darüber der Einfachhelixrührer. Der Schrägblattrührer wurde mit einem Abstand von 3 cm vom Einfachhelixrührer montiert.

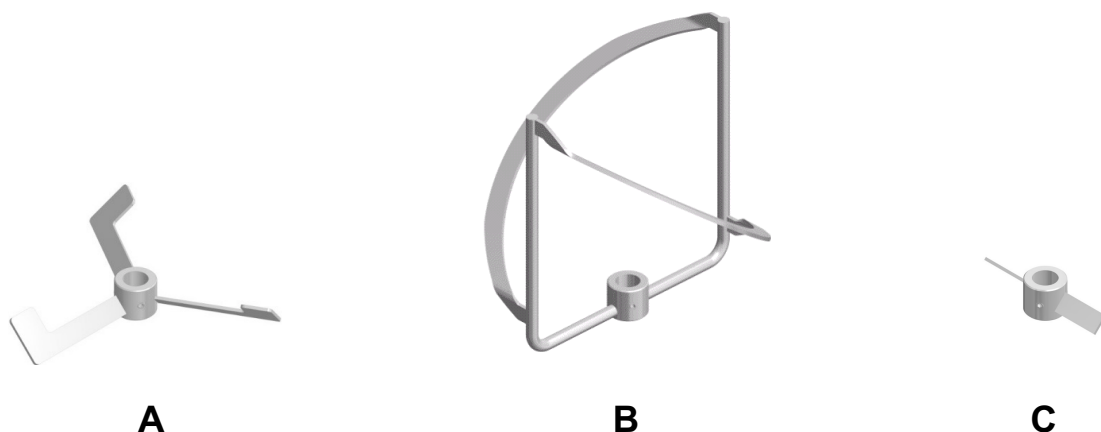


Abbildung 4.1: Rührer (A) Ankerrührer, (B) Einfachhelixrührer und ein (C) Schrägblattrührer adaptiert von der Betriebsanleitung des Labfors 5 Bioreaktors (Infors AG, 2021).

Vor dem Start des Prozesses wurde zunächst mittels Zweipunktkalibrierung die pH-Sonde auf pH 4 und pH 7 kalibriert, in den vorbereiteten Bioreaktor eingebaut und dieser mit etwa 2 L VE-Wasser gefüllt. Anschließend wurde der Bioreaktor bei 121 °C für 20 min

sterilisiert. Währenddessen wurde die Abgasanalytik (BlueVary, BlueSens Gas Sensor GmbH, Herten, Germany) mit dem Zuluftanschluss kurzgeschlossen und bei 1 L min^{-1} Druckluft auf 20,95 % Sauerstoff und 0,04 % Kohlenstoffdioxid kalibriert (Einpunktkalibrierung).

Über eine peristaltische Schlauchpumpe wurde im Anschluss der Sterilisation das Wasser aus dem Bioreaktor entfernt. Dann wurde das vorbereitete Zuckerrübenpressschnitzel Substrat mit den Sporen in einer Sterilwerkbank (SWB Klasse 1 FAZ 3, WALDNER, Holding SE & Co. KG) per Hand homogenisiert und über einen Port im Deckel mit einem sterilen Trichter hineingefüllt. Anschließend wurde der Bioreaktor an der Station angeschlossen und die Temperatur auf $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ reguliert. Während des Prozesses wurde 4 h nach Inokulation der Feststoffbioreaktor über den Kopfraum mit einer konstanten Rate von 1 L min^{-1} mit steriler Luft begast. Der zeitversetzte Start der Begasung diente der Vermeidung von Sporenaustrag aus dem Bioreaktor.

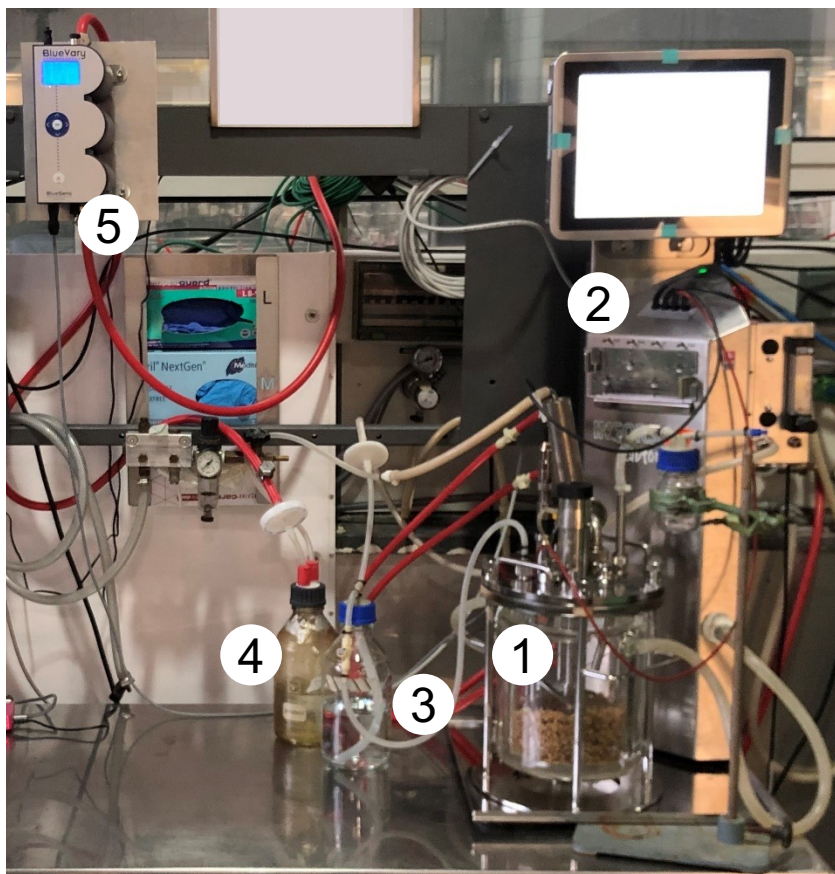


Abbildung 4.2: Anlagenaufbau für die integrierten Prozesse zur Feststofffermentation und enzymatischen Hydrolyse im 3,6 L-Maßstab. 1: 3,6 L-Rührkesselreaktor, 2: Kontrolleinheit, 3: Befeuchtungsflasche für Zuluft, 4: Abgasschaumfalle, 5: Abgasanalyseeinheit.

Die Prozesse wurden ausschließlich drucklos durchgeführt. Die Zuluft wurde zur Befeuchtung durch eine mit 0,5 L VE-Wasser gefüllte Flasche geleitet. Die Abluft wurde ebenfalls durch eine mit 0,5 L VE-Wasser gefüllte Flasche geleitet, um im späteren Hydrolyse Prozess gegebenenfalls gebildeten Schaum aufzufangen. Nach der Schaumfalle wurde die Abluft mit einem Filter vor der Abgassensorik steril filtriert.

Während der Fermentation wurde das Medium nicht homogenisiert, und da das feuchte Haufwerk bei pH 4,5 gepuffert war, wurde auch nicht titriert. Während des gesamten Prozesses wurden die Kultivierungsvariablen über die Software eve® (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) aufgezeichnet und gesteuert.

Basierend auf der CO₂-Emissionsrate (CER) und der Sauerstoffaufnahme (OUR) in Gleichung 4.1 und 4.2 erfolgte die Berechnung des Respirationsquotienten (RQ) in Gleichung 4.3 (Takors & Weuster-Botz, 2018).

Die Berechnung der CO₂-Emissionsrate erfolgte nach Gleichung 4.1.

$$\text{CER} = -\frac{\dot{V}_{g,\text{in}}}{V_L V_m} \cdot \left(Y_{\text{CO}_2,\text{in}} - \frac{1 - Y_{\text{O}_2,\text{in}} - Y_{\text{CO}_2,\text{in}}}{1 - Y_{\text{O}_2,\text{out}} - Y_{\text{CO}_2,\text{out}}} * Y_{\text{CO}_2,\text{out}} \right) \quad \text{Gleichung 4.1}$$

Mit	CER	CO ₂ -Emissionsrate, mol (L h) ⁻¹
	$\dot{V}_{g,\text{in}}$	Gasvolumenstrom Zuluft, L h ⁻¹
	V_L	Reaktionsvolumen, L
	V_m	Molvolumen, L mol ⁻¹
	Y_{CO_2}	Volumenanteil CO ₂ in Zuluft (in) und Abluft (out)
	Y_{O_2}	Volumenanteil O ₂ in Zuluft (in) und Abluft (out)

Die Berechnung der Sauerstoffaufnahme erfolgte nach Gleichung 4.2.

$$\text{OUR} = \frac{\dot{V}_{g,\text{in}}}{V_L V_m} \cdot \left(Y_{\text{O}_2,\text{in}} - \frac{1 - Y_{\text{O}_2,\text{in}} - Y_{\text{CO}_2,\text{in}}}{1 - Y_{\text{O}_2,\text{out}} - Y_{\text{CO}_2,\text{out}}} * Y_{\text{O}_2,\text{out}} \right) \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Mit	OUR	Sauerstoffaufnahme, mol (L h) ⁻¹
	$\dot{V}_{g,\text{in}}$	Gasvolumenstrom Zuluft, L h ⁻¹
	V_L	Reaktionsvolumen, L
	V_m	Molvolumen, L mol ⁻¹
	Y_{CO_2}	Volumenanteil CO ₂ in Zuluft (in) und Abluft (out)
	Y_{O_2}	Volumenanteil O ₂ in Zuluft (in) und Abluft (out)
	CER	CO ₂ -Emissionsrate, mol (L h) ⁻¹

Die Berechnung des Respirationsquotient erfolgte nach Gleichung 4.3.

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Mit	RQ	Respirationsquotient, -
	CER	CO ₂ -Emissionsrate, mol (L h) ⁻¹
	OUR	Sauerstoffaufnahme, mol (L h) ⁻¹

Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel

Nach Abschluss der Feststofffermentation wurde zur zweiten Phase des Prozesses, der enzymatischen Hydrolyse, übergeleitet. Zunächst wurden 1,715 L steriles VE-Wasser mit einer peristaltischen Pumpe über einen Anschluss am Deckel in den Bioreaktor gepumpt. Der Rührer wurde nachfolgend eingeschaltet. Die Rührerdrehzahl wurde innerhalb von 5 min schrittweise auf 220 min⁻¹ eingestellt. Parallel dazu wurde die Temperatur auf 50 °C erhöht und die pH-Regelung auf pH 4,5 mit 1 M Kaliumhydroxid oder 0,5 M Schwefelsäure gestartet.

Zur Inaktivierung von *A. niger* wurde der Bioreaktor mit sterilem Stickstoff begast, bis in der Abgasanalytik kein Sauerstoff mehr detektiert wurde. Nach 24 h enzymatischer Hydrolyse wurde über eine Öffnung im Deckel sterile gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel hinzugefügt. Diese zeitversetzte Zugabe war notwendig, um die Zuckerausbeute am Ende des Prozesses berechnen zu können. Während der ersten 24 h wurden die übrigen Zuckerrübenpressschnitzel aus der Feststofffermentation hydrolysiert, und die nachträglich zugegebenen gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel ermöglichten eine Unterscheidung der freigesetzten Zucker.

Nach dem Abschluss der Hydrolyse wurde das Hydrolysat für 30 min bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugiert (Rotana 460 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde in zwei Schritten mit 11 µm und 2,5 µm Porengröße (WhatmanTM Filterpapier Grad 1 und Grad 5, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) mit einer Nutsche vakuumfiltriert und anschließend in Whirl-Paks (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei -20 °C gelagert.

4.3.6. Satzverfahren im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab

7,5 L-Maßstab

Die Satzkultivierungen im 7,5 L-Maßstab wurden in einem Glasreaktor (Labfors 5, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit den Innenabmessungen 15 cm Durchmesser und 46,5 cm Höhe und einem Doppelmantel zur Temperaturkontrolle während der Prozesse durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug dabei 3 L. Die Software eve® (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) wurde zur Steuerung und Regelung der Prozessgrößen verwendet. Alle zugehörigen Anlagenbestandteile sind der Tabelle 10.4 im Anhang zu entnehmen, und der Aufbau des Rührkesselreaktors ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

Im Deckel des Bioreaktors befinden sich Anschlüsse für die Montage von Gelöstsauerstoff (DO)- und pH-Sonde, dem Probenahmerohr, dem Begasungsrohr, den Anschlüssen für die Titrationsmittel, dem Abgaskühler und dem Temperaturfühler. Außerdem wurden drei Strömungsbrecher an der Innenseite der Deckelplatte montiert, um eine bessere Durchmischung zu erreichen. Die Rührwelle in der Mitte der Deckelplatte wurde über eine Kupplung mit Gleitringdichtung an den Motor angeschlossen. An der Rührwelle waren von unten nach oben ein Sechsstabscheibenrührer, ein Schrägblattrührer aufwärtsfördernd und ein Schrägblattrührer abwärtsfördernd montiert. Die Abstände zwischen den unteren beiden Rührern betrugen 5 cm und zwischen den beiden Schrägblattrührern 7,5 cm. Es konnte auf den Einbau von einer Schaumsonde, aufgrund der nicht schaubildenden Eigenschaften des Mediums und des ausreichenden Kopfraumvolumens, verzichtet werden.

Die Abluft wurde über den ersten Filter (Acro® 50, BelüftungsfILTER, PTFE-Membran, Pall Filtersystems GmbH, Crailsheim, Deutschland) und den zweiten Filter (Sartobran® P, MaxiCaps®, 0,45 µm, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) steril filtriert und anschließend mit der Abgassensorik (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland) analysiert. Die Begasung des Bioreaktors erfolgte mit steriler Druckluft über die Station, wobei der Volumenluftstrom über einen Massedurchflussregler eingestellt wurde.

Zur Vorbereitung wurde der Bioreaktor zunächst zusammengebaut und mit 3 L VE-Wasser gefüllt. Anschließend wurde die pH-Sonde (EasyFerm Plus PHI Arc 425, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) über eine Zweipunktkalibrierung bei pH 4 und pH 7 kalibriert und eingebaut. Es folgte die Sterilisation des Bioreaktors bei 121 °C für 20 min und danach das Anschließen an die Station. Das VE-Wasser wurde über eine peristaltische Pumpe herausgefördert und das fertig vorbereitete Medium steril

hineingepumpt. Dann wurde auf 30 °C temperiert, die Begasung auf 0,2 vvm eingestellt und die DO-Sonde (VisiFerm DO Arc H0, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) auf 100 % Gelöstsauerstoff kalibriert. Da die Messung des Gelöstsauerstoffs über eine optische Sonde erfolgte, war keine Kalibrierung bei 0 % notwendig. Zusätzlich wurde vor Beginn des Prozesses noch die Einpunktkalibrierung der Abgasanalytik (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland) mit Druckluft auf 20,95 % Sauerstoff und 0,04 % Kohlenstoffdioxid durchgeführt.

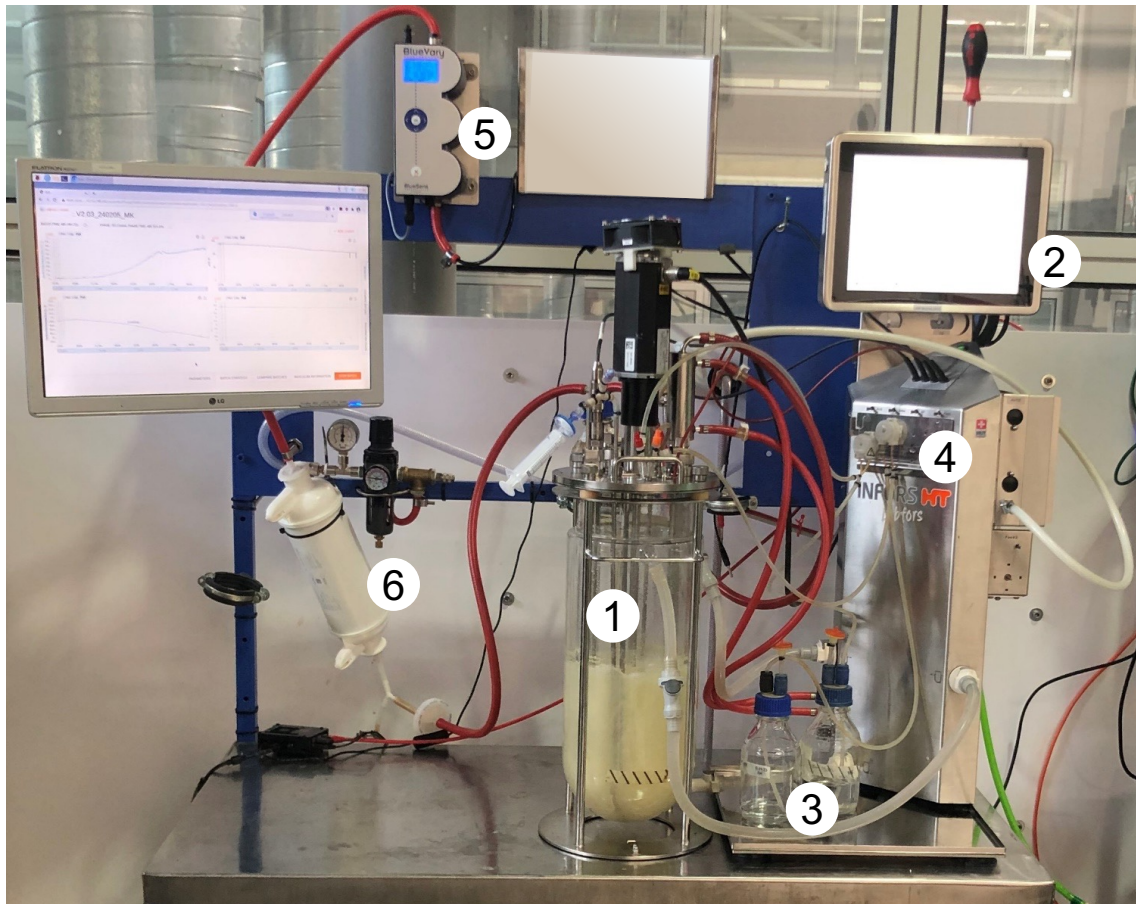


Abbildung 4.3: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 7,5 L-Maßstab. 1: 7,5 L-Rührkesselreaktor, 2: Kontrolleinheit, 3: Titrationsmittel, 4: Pumpenmodul, 5: Abgasanalyseeinheit, 6: Abgasfilter (Sartobran® P, MaxiCaps®, 0,45 µm, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Dann wurden die Start Sollwerte eingestellt (Temperatur = 30 °C, pH 4,5, Rührerdrehzahl = 660 min⁻¹) und der Satzprozess mit jeweils 30 mL einer Schüttelkolbenvorkultur (siehe Kapitel 4.3.3) inokuliert. Während des Prozesses wurde das Medium konstant auf 30 °C temperiert und der pH durch Titration mit 0,5 M Schwefelsäure und 1 M Kaliumhydroxid auf pH 4,5 kontrolliert. Es wurde eine Begasungskaskade zur Vermeidung von Sauerstofflimitierung eingestellt. Durch stufenweise Erhöhung der Begasungsrate wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration (0,2 bis 2 vvm) immer über 30 % Luftsättigung gehalten.

1,5 L-Maßstab

Die parallelisierten Satzkultivierungen im 1,5 L-Maßstab wurden in Glasrührkesselreaktoren (DASGIP, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) mit einem Arbeitsvolumen von 700 mL durchgeführt. Es konnten maximal vier identische Rührkesselreaktoren parallel eingesetzt werden, mit einem Innendurchmesser von 11 cm und 20 cm Höhe. Alle zugehörigen Anlagenbestandteile sind in Tabelle 10.5 im Anhang zu entnehmen, und der Aufbau ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Die individuelle Steuerung der Bioreaktoren und Aufzeichnung der Prozesse erfolgte über die Prozessleitsoftware DASGIP Control (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland).

Über die Deckelplatte der Rührkesselreaktoren wurden jeweils eine pH-Sonde (EasyFerm Plus PHI K8 225, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), eine Gelöstsauerstoffsonde (VisiFerm DO EXS 225 H0, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), ein Probenahmerohr, ein Begasungsrohr und Anschlüsse für die Titriermittel montiert. An der Rührwelle waren vom unteren Ende ein Sechsstabscheibenrührer und mit 2,5 cm Abstand darüber ein abwärtsfördernder Schrägblattrührer montiert. Die Begasung der Bioreaktoren erfolgte mit steriler und auf 2,5 bar geregelter Druckluft, die über einen vorgeschalteten Massendurchflussregler eingestellt werden konnte. Die Analyse der steril gefilterten Abluft erfolgte über eine Abgassensorik (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland).

Zunächst wurden die Bioreaktoren zusammengebaut und mit etwa 500 mL VE-Wasser befüllt. Dann wurden die pH-Sonden auf pH 4 und pH 7 kalibriert (Zweipunktkalibrierung) und eingebaut. Anschließend wurden die Bioreaktoren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Danach wurde das Wasser unter sterilen Bedingungen über Öffnungen an der Seite der Bioreaktoren entfernt und das fertige Medium steril hineingegeben. Schließlich wurden alle Bioreaktoren an die Station angeschlossen und für die nachfolgenden Kalibrierungen auf 30 °C temperiert und mit 2 vvm begast. Es folgte die Kalibrierung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 100 % und die Einpunktkalibrierung der Abgasanalytik auf 20,95 % Sauerstoff und 0,04 % Kohlenstoffdioxid. Da die Messung des Gelöstsauerstoffs über eine optische Sonde erfolgte, war keine Kalibrierung bei 0 % notwendig.

Dann wurden die Start Sollwerte eingestellt (Temperatur = 30 °C, pH 4,5, Rührerdrehzahl = 250 min⁻¹) und die Bioreaktoren mit Sporen inokuliert. Während der Satzprozesse wurde das Medium konstant auf 30 °C temperiert und der pH durch Titration mit 0,5 M Schwefelsäure und 1 M Kaliumhydroxid auf pH 4,5 kontrolliert. Um einen Sporenaustrag aus dem Bioreaktor zu vermeiden, wurde die ersten 3 h nicht begast und eine geringere

Rührerdrehzahl von 250 min^{-1} eingestellt. Anschließend wurde die Rührerdrehzahl auf 600 min^{-1} erhöht und eine Begasungskaskade zur Vermeidung von Sauerstofflimitierung eingestellt, sodass die Gelöstsauerstoffkonzentration durch stufenweise Erhöhung der Begasungsrate (0,2 bis 2 vvm) immer über 30 % Luftsättigung gehalten wurde.

In den Satzprozessen mit automatisierten Begasungsstopp erfolgte die Abschaltung der Luftbegasung, sobald ein definierter Schwellenwert der CO_2 -Konzentration im Abgas unterschritten wurde. Dieser Schwellenwert lag bei Verwendung des synthetischen Mediums (Kapitel 4.2.7) bei 0,6 % und bei Einsatz des Zuckerrübenschnitzel-Hydrolysat Mediums (Kapitel 4.2.8) bei 0,9 %. Direkt im Anschluss an das Erreichen des Schwellenwertes erfolgte die Begasung mit Stickstoff für 2 min, um den verbliebenen Sauerstoff in den Bioreaktoren vollständig zu verdrängen.

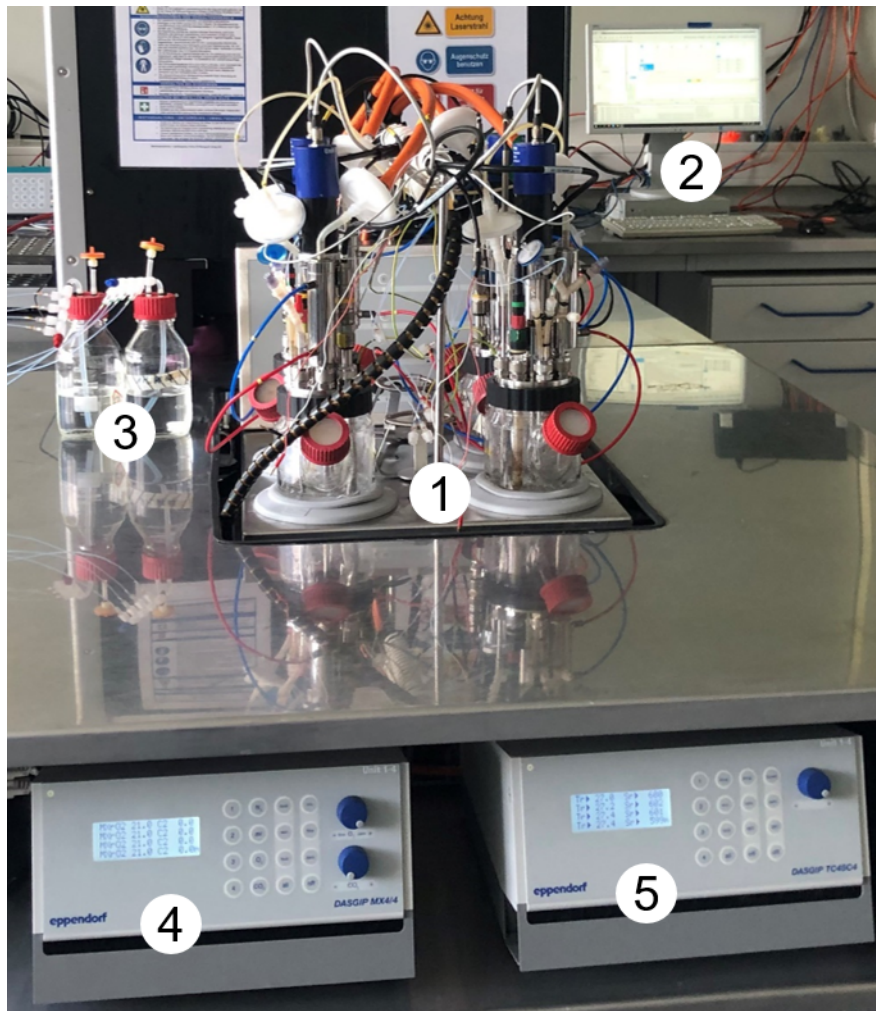


Abbildung 4.4: Anlagenaufbau für Satzprozesse im 0,7 L-Maßstab. 1: 1,5 L-Rührkesselreaktor mit Temperierungsvorrichtung, 2: Kontrolleinheit, 3: Titrationsmittel, 4: Kontrolleinheit für Zuluft, 5: Kontrolleinheit für Rührerdrehzahl.

4.4. Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel in 100 mL-Laborflaschen

Für die Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel im Labormaßstab wurden 100 mL-Laborflaschen (DURAN®, DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland) mit jeweils 30 mL eines 200 mM Natriumcitrat-Puffers mit variierenden pH (pH 3, pH 4, pH 5) sowie entweder 1,8 g oder 3,0 g gemahlener Zuckerrübenpressschnitzel befüllt. Anschließend wurden die Flaschen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach der Sterilisation wurde unter aseptischen Bedingungen 30 mL eines sterilen Feststofffermentationsüberstands zugegeben. Die hydrolytischen Enzyme aus dem Überstand wurden durch die Zugabe von 980 mL Wasser nach der Feststofffermentation extrahiert und bei einer Rührerdrehzahl von 100 min^{-1} für eine Stunde homogenisiert. Danach wurde der Überstand durch Zentrifugation ($14.000 \times g$, 10 min^{-1} , 4 °C) gewonnen und vor der Hydrolyse sterilfiltriert (Steritop® PES Membran, 0,22 µm, 45 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurden die Laborflaschen auf Magnetrührerplatten (Mehrstellen-Magnetrührer MIX 15 eco, 2mag AG, München, Deutschland) bei 40 °C oder 50 °C bei einer kontinuierlichen Rührerdrehzahl von 650 min^{-1} für fünf Tage inkubiert. Die eingesetzten PTFE ummantelte Magnetrührstäbchen (ROTILABO®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit Aluminium-Nickel-Cobalt Kern hatten einen Durchmesser von 6 mm und eine Länge von 30 mm.

Während der Inkubation wurde in regelmäßigen Zeitabständen Proben zur Zuckeranalyse unter sterilen Bedingungen in der Sterilwerkbank (SWB Klasse 1, FAZ 3, WALDNER, Holding SE & Co. KG) entnommen. Dazu wurden die Flaschen einzeln von der Magnetrührerplatte genommen und der Überstand der Hydrolyse mit einer Pipette entnommen. Alle Versuchsansätze wurden in Duplikaten durchgeführt.

4.5. Analytische Methoden

4.5.1. Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden beschriftete 2 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tube, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) zunächst bei 80 °C (Inkubator KB 53 E3.1, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für mindestens 24 h getrocknet und leer gewogen (Analysenwaage Explorer E1M213, E12145, Ohaus Waagen Vertriebs GmbH, Gießen, Deutschland). Es wurden dann jeweils im Triplikat

2 mL Probe hinein pipettiert, für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5424 R, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland), der Überstand für die Quantifizierung der Polygalacturonasen (PGase)-Aktivität und der Zuckerkonzentration (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.5.3) verwendet und der restliche Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets in den Reaktionsgefäßen für mindestens 48 h bei 80 °C getrocknet und wieder gewogen. Über die Differenz der Gewichte und das bekannte verwendete Volumen konnte somit die Biotrockenmasse der Proben berechnet werden.

4.5.2. Quantifizierung der Polygalacturonaseaktivität im Kulturüberstand

Zur Quantifizierung der PGase-Aktivität im Hydrolyseüberstand wurde ein adaptierter enzymatischer Aktivitätstest nach dem Fructan Assay Kit Protokoll (Megazyme, Bray, Irland) durchgeführt. Dieser Test beruht auf der kolorimetrischen Quantifizierung von reduzierenden Zuckern durch deren Reaktion mit der p-Hydroxybenzoesäurehydrazid in der PAHBAH Reagenz (Tabelle 4.11). Die dabei entstehenden gelben Anionen können bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden. Als Substrat für die enzymatische Reaktion wird Polygalacturonsäure verwendet. Die Säure besteht aus Poly- α -1-4 verknüpfter D-Galakturonsäure die mit den Enzymen aus dem Kulturüberstand D-Galakturonsäure-Moleküle abspaltet. Da eine Vielzahl von Enzymen für den Abbau benötigt werden kann dieser enzymatischer Aktivitätstest somit als Indikator für die pektinolytische Aktivität dienen.

Dafür wurden zunächst die Proben von dem Überstand mit 100 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 4,5) 1:200 verdünnt. Anschließend wurden 100 μ L von dem verdünnten Überstand mit 100 μ L einer zuvor vorbereiteten 10 g L⁻¹ Polygalacturonsäure Lösung gemischt. Von diesem Reaktionsansatz wurde anschließend 20 μ L in eine auf Eis gekühlte 96-Well-Mikrotiterplatte übertragen und der restliche Ansatz bei 50 °C und 1000 min⁻¹ für 60 min im Thermoschüttler (ThermoMixerC, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) in einer PCR-Platte (Rotilabo®-PCR-Platte, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Es wurden jeweils nach 20 min, 30 min, 40 min und 60 min 20 μ L Probe entnommen und ebenfalls in die auf Eis gekühlte 96-Well-Mikrotiterplatte übertragen. Währenddessen wurde der D-Galakturonsäure-Standard ebenfalls in die Mikrotiterplatte pipettiert und 1:1 mit 100 mM Natriumcitrat-Puffer gemischt. Anschließend wurden zur Quantifizierung der reduzierenden Enden im Reaktionsgemisch zuerst 150 μ L PHABAH Arbeitslösung (1:10 Mischung aus Reagenz A und B, Tabelle 4.11) zu allen Proben und Standards hinzugegeben und gemischt. Dann wurde die mit einem PCR-Film verschlossene PCR-Platte (Rotilabo®-PCR-Platte, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 6 min bei 96 °C im Thermoblock (VWR Standard Block Heater, VWR

International GmbH, Darmstadt, Deutschland) erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Anschließend wurden die Proben auf ein Endvolumen von je 125 μL in eine Mikrotiter Messplatte 1:5 mit VE-Wasser verdünnt und die Standards unverdünnt hineingegeben. Danach wurde die Absorption bei 405 nm gemessen (Multiscan FC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgt über lineare Regression, bei der die bekannte Konzentration des D-Galakturonsäure-Standards über die Absorption bei 405 nm aufgetragen wird. Für die Berechnung wurden dabei die Inkubationszeit, die Verdünnung und das Probenvolumen berücksichtigt. Die Messungen jedes Standards und jeder Probe des Kulturüberstands wurden jeweils im Triplikat durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt. Die Proben des Kulturüberstands wurden zusätzlich um den Startwert bereinigt. Die erhaltene Aktivitätseinheit ist Unit. Dabei entspricht ein Unit PGase-Aktivität einem μmol D-Galakturonsäure pro min pro mL Kulturüberstand unter Assaybedingungen.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung der PAHBAH-Reagenzien.

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

4.5.3. Quantifizierung der Zuckerkonzentrationen im Kulturüberstand

Die Zuckerkonzentrationen im Kulturüberstand der entnommenen Proben wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermittelt. Die verwendeten Anlagen des HPLC-Systems Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) sind in Tabelle 10.6 im Anhang gelistet. Die von den Prozessen entnommenen Proben wurden zunächst für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5424 R, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) und der Überstand für die Quantifizierung der Zuckerkonzentrationen verwendet. Dafür wurden die Proben anschließend, falls nötig, mit VE-Wasser verdünnt und über Spritzenvorsatzfilter (0,22 μm , Chromafil RC-20/15 MS, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) in Rollrandflaschen filtriert. Für kleinere Volumina unter 150 μL wurden Microeinsätze für die Rollrandflaschen

verwendet. Die Proben wurden anschließend direkt oder innerhalb von einer Woche nach Lagerung bei 4 °C gemessen. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ des Laufmittels 5 mM Schwefelsäure. Die Auftrennung der jeweils 20 µL Probe erfolgte mit einer auf 65 °C temperierte Kationentauschersäule (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %) LC (300 x 7,8 mm), Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland), der eine Vorsäule (SecurityGuard Catridge Carbo-H (4 x 3 mm), Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) vorgeschaltet war. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor). Zur Ermittlung der Konzentration wurden externe Standards mit Konzentrationen von 0,875 g L⁻¹ bis 10 g L⁻¹ von L-Arabinose, L-Fucose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Mannose, D-Xylose, und D-Xylitol gemessen und deren Konzentration mittels linearer Regression mit ihrer Peakfläche korreliert.

Die Berechnung der Zuckerausbeute Y zum Zeitpunkt t erfolgte nach der Gleichung 4.4.

$$Y(t) = \frac{c_p}{c_{\max}} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 4.4}$$

Mit	Y(t)	Zuckerausbeute zum Zeitpunkt t, g L ⁻¹
	c _p	Freigesetzte Zuckerkonzentration zum Zeitpunkt t, g L ⁻¹
	c _{max}	Maximal mögliche Zuckerkonzentration, g L ⁻¹

4.5.4. Mikroskopie

Zur Kontrolle möglicher Kontaminationen wurde ein repräsentativer Teil der Proben mikroskopisch betrachtet. Dafür wurde Probematerial auf Objektträger aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena, Deutschland) bei Vergrößerungen von 1,25x, 5x und 20x untersucht. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer 3,3-megapixel Digitalkamera (Axiocam ICc3, Zeiss, Jena, Deutschland) mit der dazugehörigen Software (ZEN lite, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen.

5. Prozessintegration von Enzymherstellung und enzymatischer Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel¹

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Prozessintegration von Feststofffermentation von Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* und enzymatischer Hydrolyse dieses Rohstoffes dargestellt.

5.1. Enzymherstellung mit *A. niger* im Rührkesselreaktor

Zuerst wurde die Eignung von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel als Substrat für die Feststofffermentation mit *A. niger* im Rührkesselreaktor untersucht. Der verwendete Stamm *A. niger* ATCC11414 $\Delta gaaX$ wurde vom Projektpartner (Prof. J. Philipp Benz, Professur für Pilzbiotechnologie der Technische Universität München) bereitgestellt und wird im weiteren Verlauf des Kapitels 5 lediglich mit *A. niger* bezeichnet.

Für den Satzprozess im Rührkesselreaktor wurde ein feuchtes Haufwerk aus 227 g L⁻¹ gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel eingesetzt. Die Korngrößenverteilung der eingesetzten Zuckerrübenpressschnitzel liegt bei 57,22 % im Bereich von 0,5 – 1 mm, 34,55 % unter 0,5 mm und 8,28 % zwischen 1 – 2 mm (mittlere Partikelgröße 0,6 mm). Die eingesetzte Flüssigphase enthielt die für das Wachstum von *A. niger* notwendigen Zusätze. Das Verhältnis von Feststoff zu Flüssigkeit wurde basierend auf vorherigen Untersuchungen unterschiedlicher Konzentrationen so gewählt, dass kein freies Wasser im feuchten Haufwerk vorhanden war. Das Haufwerk wurde mit $2,57 \times 10^6$ Sporen g⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel angeimpft und die anfängliche Rührerdrehzahl betrug 10 min⁻¹. Zum Homogenisieren wurden die Rührorgane Ankerrührer, Einfachhelixrührer und Schrägblattrührer eingesetzt (siehe Abbildung 4.1). Nachdem sich das feuchte Haufwerk innerhalb von 42 h zu einer Suspension verflüssigt hatte, wurde die Rührerdrehzahl auf 40 min⁻¹ erhöht. Die Begasung erfolgte über den Kopfraum mit steriler Zuluft, wobei die Luft nicht direkt durch das feuchte Haufwerk geleitet wurde, sondern durch Diffusion in das Substrat eindrang. Die anfängliche Begasungsrate mit steriler Zuluft war 0,2 L h⁻¹ und wurde nach 16 h auf 1 L h⁻¹ und nach 42 h auf 3 L h⁻¹

¹ Teile dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht in: Knesebeck, Melanie; Schäfer, Dominik; Schmitz, Kevin; Rüllke, Marcel; Benz, J. Philipp; Weuster-Botz, Dirk (2023): Enzymatic one-pot hydrolysis of extracted sugar beet press pulp after solid-state fermentation with an engineered *Aspergillus niger* strain. In: *Fermentation* **9** (582). DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9070582>.

erhöht. Die Probenahmen erfolgten unter nicht-sterilen Bedingungen durch eine Öffnung im Deckel unter Verwendung eines sterilen Spatels.

Während der Feststofffermentation nahm das Volumen kontinuierlich ab, bedingt durch die Verflüssigung des feuchten Haufwerks und der Probenahme (siehe Abbildung 10.1). Zu Beginn der Fermentation drückten die Rührorgane das Feststoffhaufwerk an die Seitenwände des Bioreaktors, wodurch sich eine etwa 2 mm dünne Schicht aus gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel an den Wänden bildete. Diese Schicht löste sich nach 63 h infolge der zunehmenden Zersetzung der Zuckerrübenpressschnitzel Partikel wieder von den Bioreaktorwänden.

Zur Prozessüberwachung wurde eine pO_2 -Sonde zur Ermittlung der Gelöstsauerstoffkonzentration eingesetzt, dessen Verlauf in Abbildung 5.1 dargestellt ist. Innerhalb der ersten 20 h sank die Sauerstoffkonzentration auf 90 % Luftsättigung ab und fiel anschließend kontinuierlich innerhalb von 60 h auf 0 %, trotz der schrittweisen Erhöhung der Begasungsrate. Auch die Erhöhung der Rührerdrehzahl nach 42 h hatte keinen Einfluss auf die Gelöstsauerstoffkonzentration. Ab 25 h wurde ein Rauschen der Messsignale für die Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet (siehe Abb. 5.1).

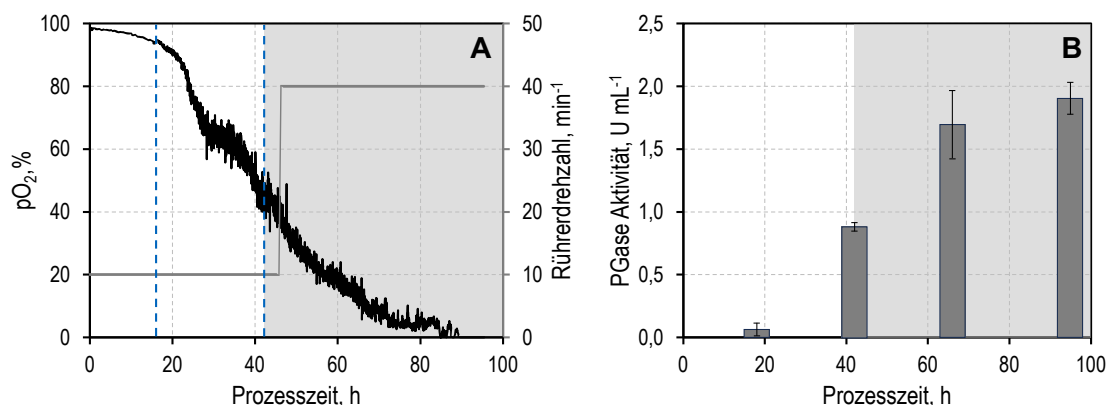


Abbildung 5.1: Umsetzung von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im Rührkesselreaktor: (A) Gelöstsauerstoffkonzentration im feuchten Haufwerk und die Rührerdrehzahl, sowie die (B) Polygalacturonase (PGase)-Aktivitäten. Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung wurde die Begasungsrate schrittweise (blau gestrichelte Linien: nach 16 h auf 1 $L \cdot h^{-1}$, nach 42 h auf 3 $L \cdot h^{-1}$) und die Rührerdrehzahl nach 42 h auf 40 min^{-1} erhöht. Die Verflüssigung des feuchten Haufwerks zur Suspension nach 42 h ist farblich grau hinterlegt. Die Messungen der PGase-Aktivität wurden in technischen Replikaten durchgeführt. ($T = 30 \text{ } ^\circ C$, $n_{initial} = 10 \text{ } min^{-1}$, $F_{Luft, initial} = 0,2 \text{ } L \cdot h^{-1}$, $pH = 4,5$, $c_{ZRPS} = 227 \text{ } g \cdot L^{-1}$, $2,57 \times 10^6 \text{ Sporen } g_{ZRPS}^{-1}$).

Die Polygalacturonase (PGase)-Aktivitäten während der Fermentation wurden ermittelt, da der eingesetzte *A. niger*-Stamm genetische Modifikationen zur erhöhten PGase-Sekretion enthielt. Dazu wurden die Proben jeweils in ein 2 mL Reaktionsgefäß gefüllt und für 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der dabei erhaltene flüssige Überstand wurde für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Die PGasen-Aktivitäten sind in

Abbildung 5.2 dargestellt. Während des Fermentationsprozesses stieg die Enzymaktivität kontinuierlich an und erreichte nach 95 h einen Endwert von $1,9 \pm 0,13 \text{ U mL}^{-1}$ im flüssigen Überstand der Proben.

Nach der Zentrifugation der Proben wurden die Zuckerkonzentrationen im Überstand bestimmt und sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Die initiale D-Glukosekonzentration betrug $2,5 \text{ g L}^{-1}$ und sank innerhalb von 42 h auf einen konstanten Wert von etwa $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bis zum Ende des Satzprozesses. Die L-Arabinosekonzentration stieg von anfänglich $0,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $6,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 96 h an. Aus den Zuckerrübenpressschnitzeln freigesetzte D-Galakturonsäure wurde erst nach 24 h gemessen und erreicht am Ende der Fermentation eine Konzentration von $4,6 \text{ g L}^{-1}$. Die Zucker D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose (XMG) konnten mit der angewandten HPLC-Methode nicht getrennt werden. Die Konzentration von XMG lag zu Beginn bei $0,6 \text{ g L}^{-1}$ und war innerhalb der ersten 24 h noch vorhanden. Nach 42 h waren diese Zucker jedoch vollständig verbraucht.

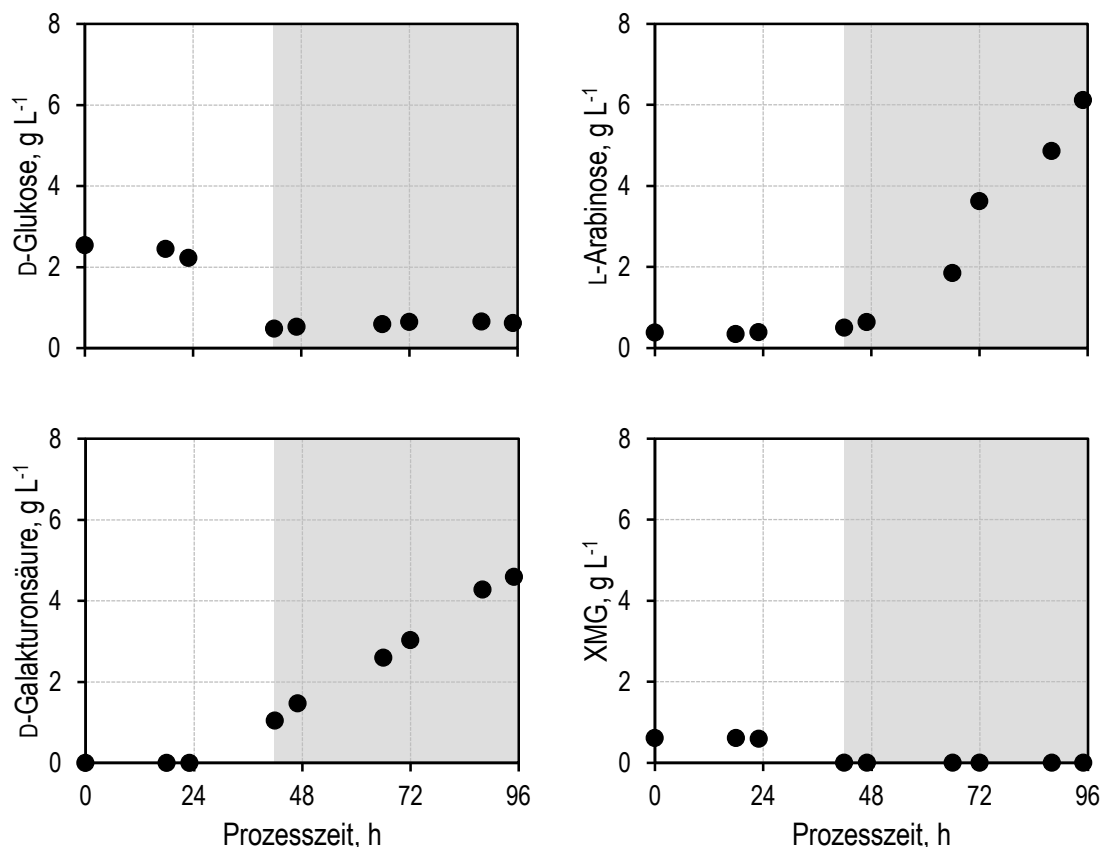


Abbildung 5.2: Umsetzung von gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im Rührkesselreaktor: freigesetzte Zuckerkonzentrationen D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG). Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung wurde die Begasungsrate schrittweise (nach 16 h auf 1 L h^{-1} , nach 42 h auf 3 L h^{-1}) und die Rührerdrehzahl nach 42 h auf 40 min^{-1} erhöht. Die Verflüssigung des feuchten Haufwerks zur Suspension nach 42 h ist farblich grau hinterlegt. ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n_{\text{initial}} = 10 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft, initial}} = 0,2 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, $c_{\text{ZRPS}} = 227 \text{ g L}^{-1}$, $2,57 \times 10^6 \text{ Sporen gZRPS}^{-1}$).

Diskussion

Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration während der Feststofffermentation mit gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel, sowie die Freisetzung und der Verbrauch von Zuckermonomeren deutet auf biologische Aktivität von *A. niger* hin.

Die anfänglich niedrige Rührerdrehzahl wurde aufgrund des hohen Widerstandes der Feststoffschüttung gewählt. Nach Verflüssigung des feuchten Haufwerks zur Suspension aus Zuckerrübenpressschnitzeln, die bereits nach 42 h optisch erkennbar war, konnte die Rührerdrehzahl erhöht werden. Das Rauschen der optischen Messsignale für die Gelöstsauerstoffkonzentration, das nach etwa 24 h einsetzte, könnte auf Veränderungen der physikalischen Eigenschaften des Substrats und daraus resultierende lokalen Schwankungen der Sauerstoffkonzentration im feuchten Haufwerk zurückzuführen sein. Die Erhöhung der Begasungsrate hatte keinen Effekt auf die Gelöstsauerstoffkonzentration. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die sterile Zuluft über den Kopfraum des Bioreaktors zugeführt wurde, anstatt durch ein Begasungsrohr direkt ins Substrat geleitet zu werden. Aufgrund des Bioreaktordesigns war es nicht möglich, ein Begasungsrohr direkt in das feuchte Haufwerk zu integrieren, da dies durch die Rührorgane blockiert worden wäre.

In einer Studie zur Sauerstofflimitierung mit unterschiedlichen Luftanteilen, die durch Mischung der Zuluft mit Stickstoff für die Begasung variiert wurden, zeigte *A. niger* ab einem Luftanteil von 25 % Sauerstofflimitierung (Diano et al., 2009). Während der Feststofffermentation wurde eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 25 % Luftsättigung nach etwa 55 h erreicht.

Ein Vergleich der in der Feststofffermentation erzielten PGase-Aktivitäten mit denen eines Satzprozesses desselben Stammes mit 30 g L^{-1} gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel zeigte deutliche Unterschiede. Während hierbei nach 83 h eine PGase-Aktivität von $146,2 \pm 10,7 \text{ U mL}^{-1}$ erreicht wurde (Schäfer, 2022), lag die finale PGase-Aktivität in der Feststofffermentation nach 95 h bei lediglich $1,9 \pm 0,13 \text{ U mL}^{-1}$. Während der Hydrolyse unterliegen die Enzyme einem ständigen Prozess der Adsorption, Desorption und Re-Adsorption auf das Substrat (Thoresen et al., 2022; Zhang et al., 2021). Mit steigendem Feststoffgehalt nimmt die Anzahl der an das Substrat gebundenen Enzyme zu, wodurch diese möglicherweise nicht mehr in der flüssigen Phase für den enzymatischen Nachweis verfügbar sind. Daher müssen Unterschiede in den gemessenen Enzymaktivitäten auch im Kontext der unterschiedlichen Substratbedingungen betrachtet werden, da der erhöhte Feststoffgehalt die

Verfügbarkeit der Enzyme in der flüssigen Phase und damit deren Nachweisbarkeit beeinflussen kann.

Zu Beginn des Fermentationsprozesses waren bereits D-Glukose, L-Arabinose und XMG im Substrat nachweisbar. Diese Zucker wurden vermutlich durch die thermische Sterilisation (121 °C, 20 min) des feuchten Haufwerks aus Zuckerrübenpressschnitzel vor der Kultivierung freigesetzt. Im Gegensatz dazu wurde D-Galakturonsäure ausschließlich enzymatisch während des Satzprozesses freigesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass eine thermische Behandlung von 100 g Zuckerrübenpressschnitzel mit 300 mL destilliertem Wasser für 20 Minuten bei 120 °C etwa 0,8 g L⁻¹ D-Glukose, 0,08 g L⁻¹ L-Arabinose, 1,4 g L⁻¹ D-Xylose, 1,2 g L⁻¹ D-Mannose und 0,02 g L⁻¹ D-Galaktose freisetzt (Ziemiński et al., 2014). Zuckerrübenpressschnitzel setzten sich aus 13,6 % D-Glukose, 21,6 % L-Arabinose, 1,2 % D-Xylose, 0,5 % D-Mannose und 6,9 % D-Galaktose bezogen auf die Trockenmasse zusammen (siehe Tabelle 4.7). Daraus ergeben sich Ausbeuten von 1,8 % D-Glukose, 0,1 % L-Arabinose, 0,09 % D-Galaktose, 35 % D-Xylose und 72 % D-Mannose durch thermische Hydrolyse, basierend auf den Daten von Ziemiński et al. (2014). Die vergleichsweise niedrigen Ausbeuten für D-Glukose, L-Arabinose und D-Galaktose zeigen, dass eine zusätzliche enzymatische Hydrolyse erforderlich ist, um höhere Zuckerkonzentrationen im Hydrolysat zu erreichen. Obwohl die Ausbeuten von D-Xylose und D-Mannose höher sind, beträgt ihr Anteil an der Gesamtzusammensetzung nur 1,7 %. Die durch das Autoklavieren des feuchten Haufwerks in diesem Experiment freigesetzten Ausbeuten betrugen zum Vergleich 8,1 % D-Glukose, 0,6 % L-Arabinose und 3,1 % D-Galakturonsäure. Die Unterschiede in den freigesetzten Zuckermengen können auf natürliche Schwankungen in der Zusammensetzung der Zuckerrübenschnitzel zurückzuführen sein, die durch variierende Anbau- und Klimabedingungen bedingt sind (Hoffmann et al., 2009).

Die Freisetzung der Zucker erfolgte zeitlich versetzt. Die Konzentrationen von D-Galakturonsäure und L-Arabinose stiegen erst nach 42 h beziehungsweise 48 h an. Die Verstoffwechselung von D-Glukose setzte erst nach 24 h ein und fiel mit dem Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration zusammen (siehe Abb. 5.1 und 5.2). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass während der anfänglichen Verzögerungsphase im Wachstum von *A. niger* noch keine oder nur geringe Mengen hydrolytischer Enzyme sekretiert wurden.

Aufgrund der Karbon-Katabolit-Repression erfolgt die Enzymsekretion bei *A. niger* üblicherweise erst, sobald die D-Glukose im Substrat verbraucht ist (Rüllke, Meyer et al., 2024; Wang et al., 2024). Der in dieser Studie eingesetzte *A. niger*-Stamm weist

aufgrund der Deletion des Repressors GaaX eine konstitutiv aktivierte PGasen-Sekretion auf. Dies könnte die frühere Freisetzung der D-Galakturonsäure im Vergleich zur L-Arabinose erklären.

Zudem scheinen die Zucker D-Glukose und XMG im Satzprozess nicht freigesetzt zu werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Pilz diese unmittelbar nach ihrer Freisetzung metabolisiert hat, sodass keine erhöhten Konzentrationen nachweisbar waren. Theoretisch hätten aus den Zuckerrübenpressschnitzel, unter Berücksichtigung ihrer monomeren Zusammensetzung (siehe Tabelle 4.7), maximal $30,9 \text{ g L}^{-1}$ D-Glukose, $49,1 \text{ g L}^{-1}$ L-Arabinose, $49,6 \text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure und $19,5 \text{ g L}^{-1}$ XMG freigesetzt werden können. Die tatsächlich erreichten Ausbeuten am Ende des Satzprozesses lagen jedoch bei 1 % D-Glukose, 12,4 % L-Arabinose, 9,3 % D-Galakturonsäure, während XMG nicht detektiert wurde.

5.2. Enzymherstellung mit *A. niger* im feuchten Haufwerk

Im nächsten Schritt wurden größere Partikelgrößen der Zuckerrübenpressschnitzel eingesetzt, um eine konstant stabile Feuchtigkeit im Haufwerk zu gewährleisten und eine unerwünschte Verflüssigung während der Fermentation zu vermeiden. Die Korngrößenverteilung der Zuckerrübenpressschnitzel betrug 62,76 % im Bereich von 2 – 4 mm, 26,76 % im Bereich von 0,5 – 2 mm und 10,48 % im Bereich von 4 – 6,3 mm (mittlere Partikelgröße 2,8 mm). Der Einsatz größerer Partikelgrößen an Zuckerrübenschnitzeln trägt gleichzeitig zur Aufrechthaltung eines ausreichenden Gasvolumens im feuchten Haufwerk bei und verbessert die Sauerstoffversorgung.

Zunächst wurden in Kulturkolben Kultivierungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um das Verhältnis von Feststoff zu Flüssigkeit in den Zuckerrübenpressschnitzeln zu untersuchen, das für ihren Einsatz in der Feststofffermentation geeignet ist. Es wurden die Konzentrationen 100 g L^{-1} , 200 g L^{-1} und 281 g L^{-1} an Zuckerrübenpressschnitzeln in Erlenmeyerkolben angesetzt und sterilisiert. Die Schütthöhe des Substrats betrug 3 cm, bei einem Bodendurchmesser des 1000 mL Kulturkolben (Duran® Kulturkolben, Erlenmeyerform, DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, Deutschland) von 13,1 cm. Anschließend wurden die Kolben jeweils mit $6,25 \times 10^6$ Sporen g^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel angeimpft und für 161 h bei 30°C inkubiert. Sauerstoff gelangte durch Diffusion in den vorhandenen Hohlräumen zwischen den Zuckerrübenpressschnitzel-Partikeln in das Substrat. Die Konzentration von 281 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel erwies sich als geeignet, da bis zum Ende der

Kultivierung die Zuckerrübenpressschnitzel feucht blieben und trotzdem kein zusätzliches Wasser freigesetzt wurde (siehe Abbildung 5.3).



Abbildung 5.3: Kultivierung von *A. niger* mit 281 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel (Korngrößenverteilung: 62,76 % zwischen 2 – 4 mm, 26,76 % zwischen 0,5 – 2 mm und 10,48 % zwischen 4 – 6,3 mm) in Kulturkolben bei 30°C für 161 h. Die Bildaufnahme erfolgte von der Unterseite des Kulturkolbens. ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $\text{CZRP} = 281 \text{ g L}^{-1}$, $2,57 \times 10^6$ Sporen gZRP^{-1}).

Bei der Verwendung größerer Korngrößen sind aufgrund der veränderten Eigenschaften des feuchten Haufwerks Prozessanpassungen im Vergleich zu gemahlene Zuckerrübenpressschnitzeln mit kleineren Korngrößen erforderlich. Eine Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration mittels pO_2 -Sonde ist nicht mehr möglich, da die Sonde nicht in eine Flüssigphase eintauchen kann. Daher wurde die metabolische Aktivität von *A. niger* anhand der CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas erfasst.

Eine pH-Messung und -Kontrolle ist ohne Flüssigphase ebenfalls nicht möglich. Um dennoch stabile pH-Bedingungen sicherzustellen, wurde das feuchte Haufwerk vor der Sterilisation mit einem Natriumcitratpuffer (pH 4,5) befeuchtet. Zudem wurde die Zuluft mit wasserdampfgesättigter Luft durchströmt, um ein Austrocknen der Zuckerrübenpressschnitzeln zu verhindern.

Die Inokulation des feuchten Haufwerks erfolgte mit $6,25 \times 10^6$ Sporen g^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel. Da während der Kultivierungen eine mechanische Homogenisierung des Substrats aufgrund von Verdichtungseffekten nicht möglich war, wurde das sterile feuchte Haufwerk manuell außerhalb des Bioreaktors mit der Sporenlösung vermischt. Dies geschah unter sterilen Bedingungen mithilfe eines sterilen Löffels. Anschließend wurde das inokulierte Haufwerk über eine Öffnung im Deckel in den Bioreaktor überführt. Sämtliche Schritte der Inokulation fanden in der Sterilwerkbank statt.

Mit diesen Prozessanpassungen wurden Satzkultivierungen in Triplikaten im Feststoffbioreaktor mit feuchtem Haufwerk aus nicht gemahlene

Zuckerrübenpressschnitzel durchgeführt. Hierfür wurden 281 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel eingesetzt, wovon 160 g im Substrat enthalten waren. Die Füllhöhe des Substrats im Bioreaktor betrug 10 cm. Die Gasphase stellte die kontinuierliche Phase dar, wobei ausschließlich eine Oberflächenbegasung erfolgte. Aufgrund des Bioreaktordesigns war eine Installation eines Begasungsrohrs oder einer perforierten Bodenplatte für eine Durchströmung des feuchten Haufwerks mit Luft nicht möglich. Das Gasvolumen im Kopfraum wurde bei einer konstanter Begasungsrate von 1 L h^{-1} alle 1,83 h ausgetauscht, während die freie Oberfläche des feuchten Haufwerks 177 cm^2 betrug.

Die Begasung wurde 6 h nach der Inokulation gestartet und bis zum Ende der Fermentation konstant bei 1 L h^{-1} gehalten. Während der Kultivierung bei 30°C zur hydrolytischen Enzymproduktion erfolgte keine Probenahme. Nach 115 h wurden 980 mL steriles VE-Wasser zu gegeben und die Rührerdrehzahl auf 100 min^{-1} eingestellt, um die von *A. niger* produzierten hydrolytischen Enzyme in die Flüssigphase zu extrahieren. Nach einer 30-minütigen Homogenisierungsphase und wurde die PGase-Aktivität in der Flüssigphase bestimmt.

In Abbildung 5.4 zeigt das feuchte Haufwerk aus Zuckerrübenpressschnitzel während der Feststofffermentation. Während der gesamten Prozesszeit trat kein freies Wasser auf. Nach 115 h wurde eine starke Sporenbildung festgestellt.



Abbildung 5.4: Umsetzung von Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 ΔgaaX im feuchten Haufwerk: Abbildung des feuchten Haufwerks nach (A) 1 h, (B) 44 h, (C) 94 h und (D) 115 h. Nach 115 h wurde eine starke Sporenbildung festgestellt. ($T = 30^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $C_{\text{ZRPS}} = 281 \text{ g L}^{-1}$, $6,25 \times 10^6$ Sporen $\text{g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Abbildung 5.5 zeigt den Verlauf der CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas während der Feststofffermentation. Die Verzögerungsphase erstreckte sich über die ersten 10 h. Nach etwa 17 h stieg die CO_2 -Konzentration exponentiell an und erreichte ihre Maximalwerte von 1,5 % (blau), 1,6 % (schwarz), 1,7 % (grau) nach 27 h, 29 h und 32 h. Anschließend fiel die CO_2 -Konzentration zunächst steil bis etwa 48 h Prozesszeit und sank danach kontinuierlich bis zum Ende der Fermentation ab. Die O_2 -Konzentrationen zeigten den inversen Verlauf zu den CO_2 -Konzentrationen.

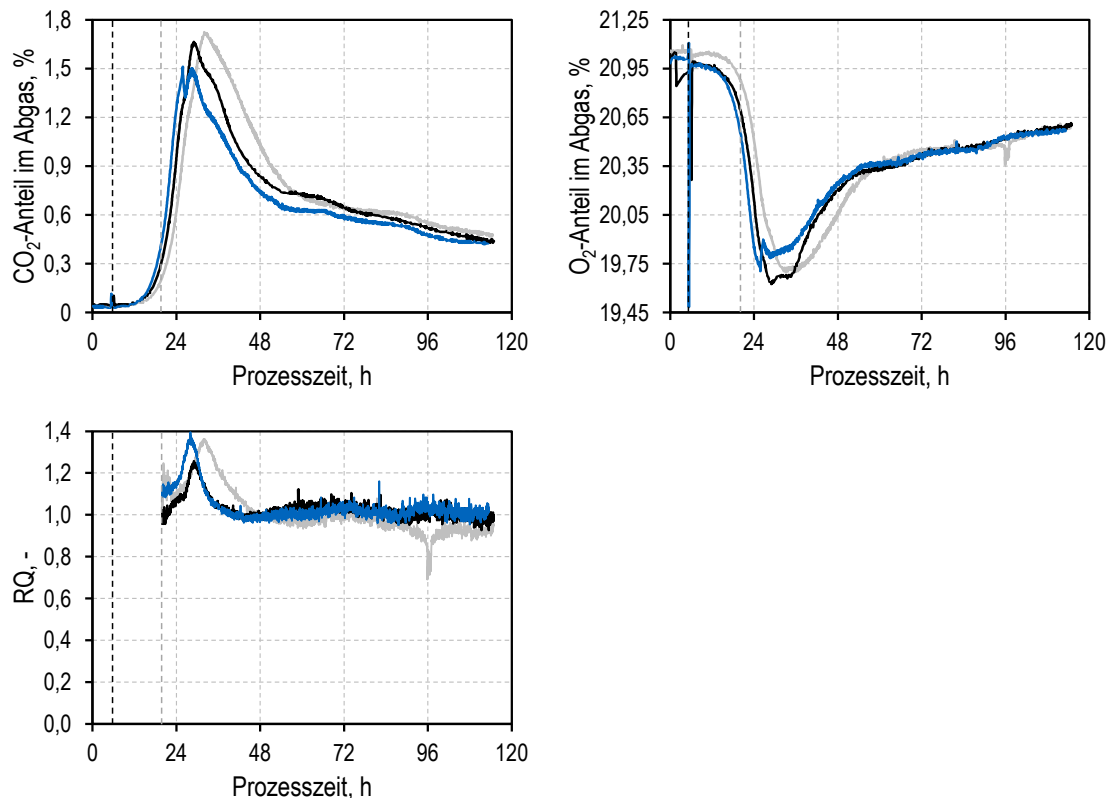


Abbildung 5.5: Umsetzung von Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 ΔgaaX im feuchten Haufwerk (Triplikat): Verlauf der CO_2 - und O_2 -Konzentrationen sowie die Respirationsquotienten (RQ). Die schwarz gestrichelten Linien markieren den zeitversetzten Beginn der Begasung nach 6 h zur Vermeidung eines Sporenaustrags. Die grau gestrichelte Linie zeigt den Beginn der RQ-Darstellung nach 20 h. In blau ist der Prozess mit der niedrigsten, in schwarz mit der mittleren und in grau mit der höchsten metabolischen Aktivität dargestellt. ($T = 30^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1\text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $c_{\text{ZRPS}} = 281\text{ g L}^{-1}$, $6,25 \times 10^6\text{ Sporen g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Der Respirationsquotient (RQ) wurde basierend auf den CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas berechnet und ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung waren die RQ-Werte aufgrund starker Schwankungen nicht aussagekräftig, weshalb sie erst ab 20 h dargestellt sind. Die maximalen RQ-Werte traten jeweils zeitgleich mit den höchsten CO_2 -Konzentrationen im Abgas auf. Die Satzprozesse mit der höchsten (grau) und niedrigsten (blau) metabolischen Aktivität, bestimmt anhand der maximalen CO_2 -Konzentrationen, erreichten jeweils einen maximalen RQ-Wert von etwa 1,37. Der

Satzprozess mit der mittleren metabolischen Aktivität (schwarz) zeigte einen maximalen RQ-Wert von etwa 1,24. Nach 48 h stabilisierte sich der RQ-Wert bei allen drei Satzprozessen auf etwa 1. Beim Prozess mit der höchsten metabolischen Aktivität (grau) sank der RQ-Wert gegen Ende der Feststofffermentation auf etwa 0,93 ab.

Die ermittelten PGase-Aktivitäten der drei Satzprozesse nach 115 h Fermentation und anschließender Extraktion der Enzyme mit VE-Wasser sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Die Enzymaktivitäten in der Flüssigphase betrugen $128,9 \pm 17,4 \text{ U g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel für den Prozess mit der mittleren, $141,1 \pm 29,8 \text{ U g}^{-1}$ für den Prozess mit der höchsten und $165,3 \pm 7,4 \text{ U g}^{-1}$ für den Prozess mit der niedrigsten metabolischen Aktivität. Die Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den Prozessen mit der höchsten (grau) und mittleren (schwarz) metabolischen Aktivität sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,58$), ebenso wenig zwischen der höchsten (grau) und niedrigsten (blau) ($p = 0,31$). Hingegen war der Unterschied zwischen den Prozessen mit der mittleren (schwarz) und niedrigsten (blau) metabolischen Aktivität statistisch signifikant ($p = 0,04$) (siehe Abbildung 5.6).

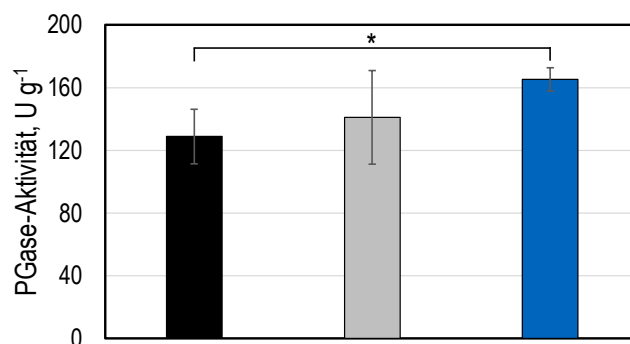


Abbildung 5.6: Umsetzung von Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im feuchten Haufwerk im Rührkesselreaktor (Triplikat): PGase-Aktivitäten nach 115 h Feststofffermentation. Nach der Fermentation wurden jeweils 980 mL steriles VE-Wasser zur Extraktion der Enzyme in den Bioreaktor gegeben und die Suspension für 30 min bei 100 min^{-1} gerührt. Die PGase-Aktivitäten wurden in technischen Replikaten bestimmt. In blau ist der Prozess mit der niedrigsten, in schwarz mit der mittleren und in grau mit der höchsten metabolischen Aktivität (basierend auf den maximalen CO_2 -Konzentrationen im Abgas) dargestellt. Die Unterschiede in der Enzymaktivität sind für den Prozess mit der mittleren (schwarz) und niedrigsten (blau) metabolischen Aktivität statistisch signifikant (* $p = 0,04$). ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $c_{\text{ZRPS}} = 281 \text{ g L}^{-1}$, $6,25 \times 10^6 \text{ Sporen g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Diskussion

Da die pO_2 -Sonde der Umsetzung von Zuckerrübenpressschnitzeln mit *A. niger* im feuchten Haufwerk keine verwertbaren Daten mehr liefert, ist ein direkter Vergleich der metabolischen Aktivität mit dem Satzprozess mit geringeren Zuckerrübenpressschnitzel Korngrößen (siehe Kapitel 5.1) nicht möglich.

Die drei Versuchsansätze mit feuchtem Haufwerk zeigten ähnliche Verläufe der CO₂- und O₂-Konzentrationen im Abgas. Unterschiede können durch die variierende Zusammensetzung der Naturstoffe bedingt sein, die aufgrund unterschiedlicher Wachstums-, Behandlungs- oder Lagerungskonditionen entstehen können (Gruska et al., 2022; Li et al., 2018). Dies wurde bereits für andere Agrarreste nachgewiesen, beispielsweise für Sojatreste, der als Nebenprodukt bei der Sojamilchproduktion anfällt (Abraham et al., 2017). Zusätzlich könnte die manuelle Inokulation zu Inhomogenitäten in der Verteilung der Sporen geführt haben, was zu Verzögerungen im Wachstum führte. Zudem ist bekannt, dass die Sporulation filamentöser Pilze heterogen verlaufen kann, was ebenfalls zu den beobachteten Unterschieden beitragen könnte (Müller et al., 2022).

Die RQ-Werte in den Satzprozessen lagen zwischen 20 h und 48 h über 1. Dies deutet darauf hin, dass eine hohe Verfügbarkeit leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen vorlag, wodurch vermehrt CO₂ produziert wurde (Dilly, 2001, 2003, 2004). Laut Godley (2004) sind RQ-Werte in Satzprozessen während der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten und deuten darauf hin, dass die Mikroorganismen wachsen und nicht gestresst sind. Ein RQ-Wert über 1 kann zudem darauf hinweisen, dass der Energiebedarf der Mikroorganismen nicht ausschließlich durch aerobe Stoffwechselwege gedeckt wird, sondern auch anaerobe Wege zur Energiegewinnung eine Rolle spielen (Lamy et al., 2013). Ein RQ-Wert von 1 zeigt hingegen ein Gleichgewicht von CO₂-Produktion zur O₂-Verbrauch und ist typisch für eine vollständige aerobe Atmung von beispielsweise D-Glukose (Dilly, 2001; Takors & Weuster-Botz, 2018).

Die Sporenbildung von *A. niger* wird nach einer Phase des vegetativen Wachstums auf feststoffhaltigen Medien automatisch induziert (Krijgsheld et al., 2013), was eine Erklärung für die beobachtete Sporenbildung nach 115 h sein kann. Im integrierten Verfahren ist es jedoch sinnvoll, Sporenbildung während der Enzymherstellung zu vermeiden. Dadurch kann eine Keimung der Sporen während der anschließenden enzymatischen Hydrolyse verhindert werden.

Bei einer Maßstabsvergrößerung dieser Prozessführung würden sich sowohl die Höhe der Schüttung und als auch die Oberfläche durch einen größeren Durchmesser vergrößern. In diesem Fall wäre eine direkte Durchströmung des feuchten Haufwerks mit der Gasphase, beispielsweise über eine perforierte Bodenplatte, erforderlich (Mitchell et al., 2019). Zudem müsste die Inokulation an den Maßstab angepasst werden. Dabei könnte beispielsweise eine Sporensuspension über Sprühdüsen oder Zerstäuber eingebracht werden und anschließend durch geeignete Rührorgane verteilt werden (Mitchell et al., 2019).

Beim Vergleich der PGase-Aktivitäten zeigte sich eine deutliche Steigerung bei der Feststofffermentation im feuchten Haufwerk mit größeren Partikelgrößen. Während der Satzprozess mit gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel nach 95 h zu einer Enzymaktivität von $1,9 \pm 0,13 \text{ U mL}^{-1}$ (entspricht $8,4 \pm 0,6 \text{ U g}^{-1}$) führte (siehe Kapitel 5.1), erreichten die Enzymaktivitäten im feuchten Haufwerk im Mittelwert $147,1 \text{ U g}^{-1}$, was eine signifikante Steigerung darstellt.

5.3. Enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel

5.3.1. Parameterstudien zur Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzeln

Mit einem Fermentationsüberstand, der die hydrolytischen Enzyme nach der Enzymherstellung im feuchten Haufwerk mit *A. niger* enthält, wurden Parameterstudien in 100-mL-Laborflaschen (Duran DURAN®, DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland) in Duplikaten durchgeführt. Hierzu wurde der Überstand aus dem Satzprozess mit der niedrigsten metabolischen Aktivität von *A. niger* verwendet (siehe Kapitel 5.2). Die von *A. niger* sekretierten hydrolytischen Enzyme wurden durch die Zugabe von 980 mL Wasser extrahiert und durch Rühren bei 100 min^{-1} homogenisiert.

Unterschiedliche Parameter wurden variiert, um deren Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln zu untersuchen. Der Feststoffgehalt wurde durch die Zugabe von 1,8 g oder 3,0 g Zuckerrübenpressschnitzel in 60 mL Flüssigphase variiert, wodurch sich Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen von 30 g L^{-1} beziehungsweise 50 g L^{-1} ergaben. Zusätzlich wurden der pH (pH 3 – 5) und die Temperatur (30°C , 50°C) variiert. Die Ansätze wurden anschließend für 49 h inkubiert.

Die Zuckerkonzentrationen nach 49 h enzymatischer Hydrolyse in den verschiedenen Versuchsansätzen sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Der Überstand, der aus der Enzymherstellung gewonnen wurde, enthielt bereits Zucker. Zudem wurde durch die Sterilisation der Zuckerrübenpressschnitzel für die Parameterstudie ebenfalls Zucker freigesetzt. Erwartungsgemäß waren die absoluten Zuckerkonzentrationen bei den 50 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel-Ansätzen ebenfalls erhöht.

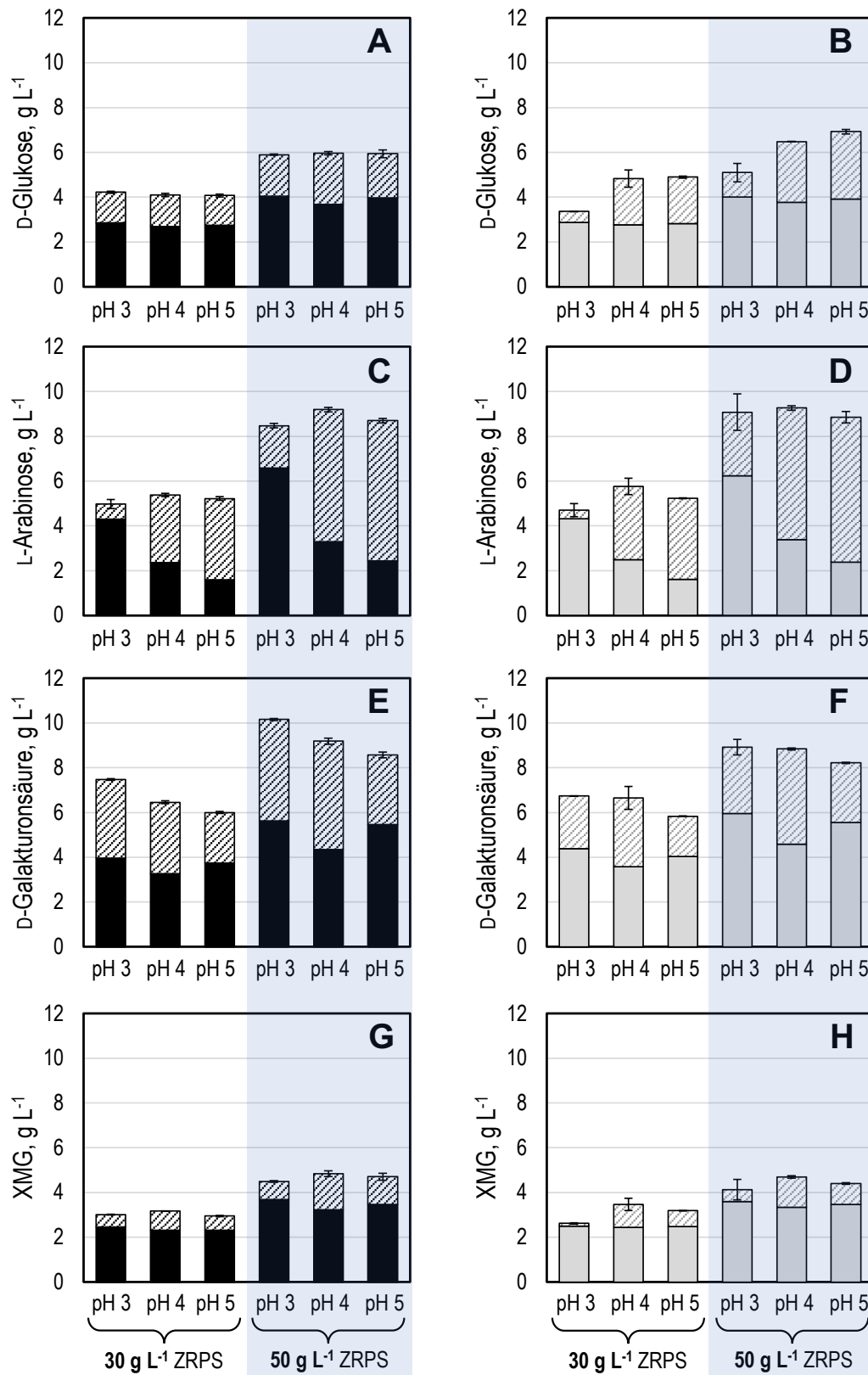


Abbildung 5.7: Parameterstudie zur enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel in 100-mL-Laborflaschen. Die finalen Zuckerkonzentrationen mit den jeweiligen Anteilen der enzymatisch freigesetzten Zucker (gestreifter Balkenanteil) nach 49 h: (A, B) D-Glukose, (C, D) L-Arabinose, (E, F) D-Galakturonsäure und (G, H) D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG). Vergleich der Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen 30 g L⁻¹ (linke Diagrammseite) bzw. 50 g L⁻¹ (blau markiert). Die Temperatur betrug 40 °C (schwarz: A, C, E, G) bzw. 50 °C (grau: B, D, F, H). Der pH variierten zwischen pH 3, pH 4 und pH 5.

Die enzymatische Freisetzung von D-Glukose war bei 50 °C am höchsten. Die höchsten Endkonzentrationen nach 49 h Hydrolyse betrugen 6 g L⁻¹ (30 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 6,9 g L⁻¹ (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) D-Glukose. Die niedrigsten Konzentrationen wurden bei pH 3 und 50 °C enzymatisch freigesetzt.

Die maximalen L-Arabinosekonzentrationen betrugen 5,8 g L⁻¹ (30 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 9,3 g L⁻¹ (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) und wurden bei pH 4 und 50 °C erreicht. Die enzymatische Freisetzung war bei pH 5 am höchsten, jedoch sehr ähnlich zu pH 4, während pH 3 die niedrigsten L-Arabinosekonzentrationen lieferte.

Die höchste Konzentration an D-Galakturonsäure wurde bei pH 4 und 50 °C enzymatisch freigesetzt, mit freigesetzten Konzentrationen von 2,9 g L⁻¹ (30 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 4,5 g L⁻¹ (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel). Ähnliche Werte wurden bei pH 4 und 40 °C sowie bei pH 3 und 40 °C festgestellt. Die niedrigsten enzymatisch freigesetzten Konzentrationen wurden bei pH 5 sowie bei der Kombination aus pH 3 und 50 °C gemessen.

Die freigesetzten Konzentrationen von XMG waren im Vergleich zu den anderen Zuckern gering. Die höchsten enzymatisch freigesetzten Konzentrationen wurden bei pH 4 mit 0,7 g L⁻¹ (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 1,3 g L⁻¹ (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) erreicht. Die niedrigsten Konzentrationen wurden bei pH 3 erreicht.

Die Ausbeuten sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Die Berechnung der Gesamtzuckerausbeute berücksichtigt sowohl die Freisetzung durch die thermische Sterilisation der Zuckerrübenpressschnitzel als auch die anschließende enzymatische Hydrolyse, wobei die durch den Enzymüberstand eingebrachten Zucker subtrahiert wurden. Zur Berechnung wurde die in Tabelle 4.7 dargestellte Zusammensetzungsanalyse der Zuckerrübenpressschnitzel herangezogen (siehe Kapitel 4.2.5). Der D-Glukoseanteil der Zuckerrübenpressschnitzel wurde jedoch nicht gemäß dieser Tabelle übernommen, sondern basierend auf dem Literaturmittelwert von 22 % nach Knesebeck et al. (2023) angenommen.

Aufgrund hoher Variabilität konnten die Ausbeuten der XMG-Konzentrationen nicht zuverlässig berechnet werden, mit nicht plausiblen Werten über 100 %, weshalb diese nachfolgend nicht berücksichtigt werden.

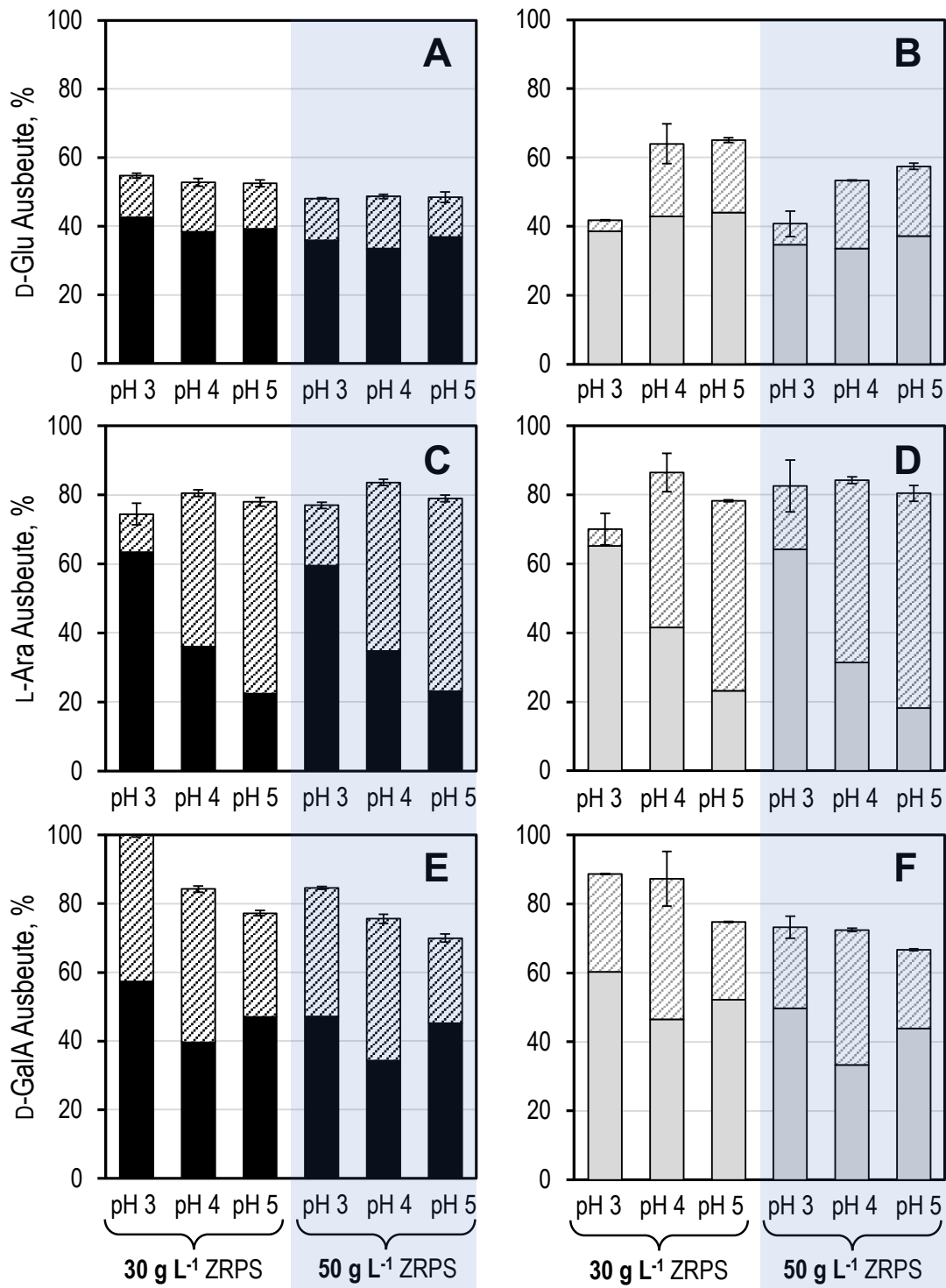


Abbildung 5.8: Parameterstudie zur enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel in 100 mL Laborflaschen. Gesamte Zuckerausbeuten und jeweilige Anteile der enzymatisch freigesetzten Zucker (gestreifter Balkenanteil) nach 49 h Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse: (A, B) D-Glukoseausbeute, (C, D) L-Arabinoseausbeute und (E, F) D-Galakturonsäure-Ausbeute. Vergleich der Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen von 30 g L⁻¹ (linke Diagrammseite) und 50 g L⁻¹ (blau markiert). Die Temperatur betrug 40 °C (schwarz: A, C, E) bzw. 50 °C (grau: B, D, F). Der pH variierte zwischen pH 3, pH 4 und pH 5.

Die niedrigste Gesamtausbeute für D-Glukose wurde bei pH 3 und 50 °C mit 41,8 % (30 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 40,8 % (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) erreicht. Die höchste Ausbeute zeigte sich bei pH 4 und pH 5 bei 50 °C, wobei bei pH 5 Werte von 65 % (30 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) beziehungsweise 57,4 % (50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel) erzielt wurden. Die Gesamtausbeuten waren bei höheren Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen leicht reduziert. Der Anteil der enzymatischen Hydrolyse (gestreifte Balken in Abbildung 5.8) ergab bei jeweils 50 °C Ausbeuten von etwa 20 %.

Die L-Arabinoseausbeuten lagen unabhängig von Temperatur und Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentration konstant bei etwa 80 %. Der durch das Autoklavieren freigesetzte Anteil variierte jedoch stark. Bei pH 3 wurde mit 65 % die höchste Freisetzung beobachtet, während bei pH 5 nur etwa 20 % freigesetzt wurden. Die niedrigste enzymatische Ausbeute wurde bei 50 °C und pH 3 gemessen, die höchste von etwa 60 % bei allen pH 5 Ansätzen.

Die Freisetzung der D-Galakturonsäure war insgesamt am höchsten bei pH 3 und 40 °C mit einer Ausbeute von 99,95 %. Durch das Autoklavieren wurde bei pH 3 der größte Anteil freigesetzt, während bei pH 4 die geringste Freisetzung stattfand. Es zeigte sich, dass bei einer geringeren Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentration leicht höhere Mengen an D-Galakturonsäure Anteilen freigesetzt wurden. Die geringste Freisetzung wurde bei 50 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel bei pH 5 unabhängig von der Temperatur beobachtet.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass ein erheblicher Anteil der Zucker bereits durch die thermische Hydrolyse während des Autoklavierens mit Natriumcitrat-Puffer beim jeweiligen pH freigesetzt wird. Dabei wurde D-Glukose zu fast 40 % aus den Zuckerrübenpressschnitzel freigesetzt, während die Freisetzung von L-Arabinose stark pH-abhängig war und bei pH 3 mit etwa 65 % Ausbeute am höchsten ausfiel, ebenso wie die Freisetzung von etwa 60 % D-Galakturonsäure. Die Kombination aus pH 3 und hohen Temperaturen beim Sterilisieren resultierte in der höchsten initialen Zuckerfreisetzung.

Die Temperatur zeigte einen deutlichen Einfluss auf die D-Glukoseausbeuten. Bei 50 °C und pH 4 oder pH 5 wurden signifikant höhere Werte als bei 40 °C erzielt. Laut Literatur liegt der optimalen pH für Cellulasen aus *A. niger* zwischen pH 4,0 und pH 5,5, und der optimale Temperaturbereich zwischen 35 °C und 60 °C mit höchster Langzeitstabilität bei 37 °C (Farinas et al., 2010). Hinsichtlich der Beladungsmenge zeigten die Enzyme

keine Inhibierung bei höheren Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen und den entsprechend höheren D-Glukosekonzentrationen, sodass vermutlich noch höhere Substratkonzentrationen und eine verlängerte Hydrolysezeit möglich wären.

Die höheren L-Arabinosekonzentrationen bei einer Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentration von 50 g L^{-1} im Vergleich zu 30 g L^{-1} , bei gleichzeitig konstanten Ausbeuten von etwa 80 %, lassen auf eine geringe Halbwertszeit der Enzyme oder eine eingeschränkte Substratzugänglichkeit schließen. Die finalen L-Arabinoseausbeuten waren zudem unabhängig von Temperatur und pH. Dies könnte zudem darauf hindeuten, dass die Zugänglichkeit der L-Arabinose freisetzenden Enzymen mit zunehmender Freisetzung abnimmt, sodass verbleibende L-Arabinose in weniger zugänglichen Polymerstrukturen gebunden bleibt. Generell stellt die begrenzte Zugänglichkeit der lignocellulosehaltigen Biomasse für hydrolytische Enzyme ein wesentlicher Faktor dar, der die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse limitiert (Meng & Ragauskas, 2014).

Die höchste thermische Freisetzung von L-Arabinose aus den Zuckerrübenpressschnitzeln durch Sterilisation trat bei pH 3 mit etwa 60 % auf, während sie bei pH 5 nur etwa 20 % betrug. Dennoch blieben die Gesamtausbeuten am Ende ähnlich, obwohl die initiale Freisetzung durch Sterilisation bei unterschiedlichen pH variierte. Die höchste enzymatische Freisetzung von L-Arabinose aus Zuckerrübenpressschnitzel trat bei pH 5 mit etwa 60 % auf. In der Literatur beschriebenen Arabinasen von *A. niger* hatten ein Temperaturoptimum zwischen $50 - 60 \text{ °C}$ bei pH 3,7 bis pH 5,0 (Voragen et al., 1987).

Die thermische Freisetzung von D-Galakturonsäure war bei 30 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzeln und pH 3 am höchsten. Die geringste thermische Freisetzung erfolgte bei pH 4, wobei hier die höchste enzymatische Freisetzung unabhängig von der Temperatur erzielt wurde. Allgemein waren die Ausbeuten bei 40 °C höher als bei 50 °C . In der Literatur sind als optimal pH 4,5 bis pH 6,0 und Temperaturen unter 50 °C für von *A. niger* sekretierten PGasen beschrieben (Gomes et al., 2011; Kashyap et al., 2001). Außerdem wurden Halbwertszeiten der PGasen von 276 h bei 50 °C ermittelt (Pili et al., 2015).

Aufgrund der geringen XMG-Konzentrationen konnten keine zuverlässigen Ausbeuten berechnet werden. Ein großer Teil der XMG wurde bereits durch das Autoklavieren freigesetzt. Die Betrachtung der Konzentrationen zeigte jedoch, dass pH 4 unabhängig von der Temperatur und Beladung am besten geeignet war.

Die in diesem Versuch freigesetzten Zuckerkonzentrationen sind mit Literaturwerten vergleichbar, in denen Kombinationen aus kommerziellen pilzlichen Enzymen (Cellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen) verwendet wurden. Dabei wurden Ausbeuten von 94 % L-Arabinose und 63 – 79 % D-Glukose erzielt (Semenova et al., 2019).

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Temperatur von 50 °C die höchsten Gesamtausbeuten lieferte, insbesondere bei der D-Glukosefreisetzung. Da höhere Endkonzentrationen für nachfolgende Biotransformationen vorteilhaft sind, wäre es sinnvoll höhere Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen einzusetzen. Die eingesetzten Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen führten bisher nicht zur Enzyminhibierung, sodass höhere Konzentrationen verwendet werden könnten.

5.3.2. Voruntersuchungen zur Prozessintegration von Enzymherstellung und enzymatischer Hydrolyse

Für die enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel unter Verwendung der während der Feststofffermentation hergestellten hydrolytischen Enzyme wurde ein integrierter Prozess durchgeführt. Der integrierte Prozess ermöglicht die Feststofffermentation mit der enzymatischen Hydrolyse in einem Bioreaktor.

Die Feststofffermentationen mit den höchsten metabolischen Aktivitäten (siehe Kapitel 5.2) wurden für das integrierte Verfahren herangezogen. Eine Modifikation im Bioreaktor gegenüber der Fermentation mit gemahlenen Zuckerrübenschnitzel (Kapitel 5.1) war das Fertigen und das Einbauen eines Probenahmerohrs, das eine sterile Probenahme während der Hydrolyse ermöglichte.

Nach Abschluss der Satzprozesse mit *A. niger* im feuchten Haufwerk wurde nach Zugabe von 980 mL VE-Wasser die Rührerdrehzahl auf 100 min⁻¹ eingestellt und der pH auf 4,5 geregelt. Während der Enzymherstellung bildete *A. niger* Myzelstrukturen aus, die die Zuckerrübenpressschnitzel-Partikel miteinander verbanden, wodurch eine Homogenisierung durch Rühren nach der Wasserzugabe erschwert wurde. Bei einer Rührerdrehzahl von 100 min⁻¹ lösten sich die Zuckerrübenpressschnitzel erst nach etwa 5 h vom zusammenhängenden Substratverbund. Zur Inaktivierung des Stoffwechsels von *A. niger* wurde die Begasung mit Zuluft gestoppt und die Temperatur für die enzymatische Hydrolyse auf 40 °C erhöht. Anschließend wurden die verbliebenen Zuckerrübenpressschnitzel aus der Enzymherstellung zunächst für 24 h unter diesen Bedingungen hydrolysiert. Ziel war es, eine Sättigung der freigesetzten

Zuckerkonzentrationen zu erreichen, um diese später bei der Berechnung der Zuckerausbeuten berücksichtigen zu können.

Nach 24 h Restehydrolyse wurden frische gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel zugegeben. Im ersten Ansatz wurde hierfür eine Stammlösung gemahlener Zuckerrübenpressschnitzel in VE-Wasser hergestellt und autoklaviert. Die Zugabe eines Teils dieser Stammlösung erfolgte über eine Öffnung im Deckel, wobei die exakte eingesetzte Menge gravimetrisch bestimmt wurde. In diesem Ansatz wurden 51,4 g Zuckerrübenpressschnitzel und 205,6 mL Wasser zugeben.

Im zweiten Ansatz wurde aufgrund praktischer Erwägungen eine stärker verdünnte Zuckerrübenpressschnitzel-Suspension verwendet. Hierfür wurden 60 g Zuckerrübenpressschnitzel mit 500 mL Wasser vorab autoklaviert und nach 24 h Hydrolyse zugegeben.

Die Zuckerkonzentrationen im Überstand bei der Hydrolyse wurden bestimmt und sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Innerhalb der ersten 24 h vor der Zugabe gemahlener Zuckerrübenpressschnitzel wurden die verbliebenen Zuckerrübenpressschnitzel des Substrats enzymatisch hydrolysiert. Nach 24 h Hydrolyse waren die Zuckerkonzentrationen im ersten Ansatz niedriger und betrugen $5,6 \text{ g L}^{-1}$ D-Glukose und stiegen nach der Zuckerrübenpressschnitzel Zugabe auf $8,3 \text{ g L}^{-1}$. Zunächst blieb die D-Glukosekonzentration konstant und sank schließlich leicht ab. Im zweiten Ansatz betrug die D-Glukosekonzentration $7,6 \text{ g L}^{-1}$ und stieg nach der Zugabe gemahlener Zuckerrübenpressschnitzel auf einen finalen Wert von $10,6 \text{ g L}^{-1}$.

Die L-Arabinosekonzentration erhöhte sich in den ersten 24 h der Hydrolyse auf $0,9 \text{ g L}^{-1}$. Nach Zugabe der gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel stiegen die Konzentrationen nach 48 h signifikant auf $6,6 \text{ g L}^{-1}$ im ersten Ansatz und $4,7 \text{ g L}^{-1}$ im zweiten Ansatz. Innerhalb von 24 h wurden im ersten Ansatz zudem $2,3 \text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure und nach der Zugabe der gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel $5,2 \text{ g L}^{-1}$ freigesetzt. Im Vergleich dazu wurden im zweiten Ansatz $1,7 \text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure und nach der Zuckerrübenpressschnitzel Zugabe $3,9 \text{ g L}^{-1}$ final erreicht.

Die Konzentration von XMG lag nach 24 h Hydrolyse bei $1,3 \text{ g L}^{-1}$ im ersten und $2,4 \text{ g L}^{-1}$ im zweiten Ansatz. Nach der Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel stiegen die XMG-Konzentrationen zunächst an, bevor sie im ersten Ansatz wieder abnahmen oder im zweiten Ansatz relativ konstant blieben. Die finalen XMG-Konzentrationen betrugen $2,9 \text{ g L}^{-1}$ im ersten und $3,1 \text{ g L}^{-1}$ im zweiten Ansatz. Aufgrund der unterschiedlichen Zuckerrübenpressschnitzel- und Flüssigphaseanteile im Hydrolysat sind die absoluten

Werte beider Prozesse nicht vergleichbar. Die summierten Gesamtzuckerkonzentration nach 48 h Hydrolyse waren $23,1 \text{ g L}^{-1}$ im ersten und $22,4 \text{ g L}^{-1}$ im zweiten Ansatz.

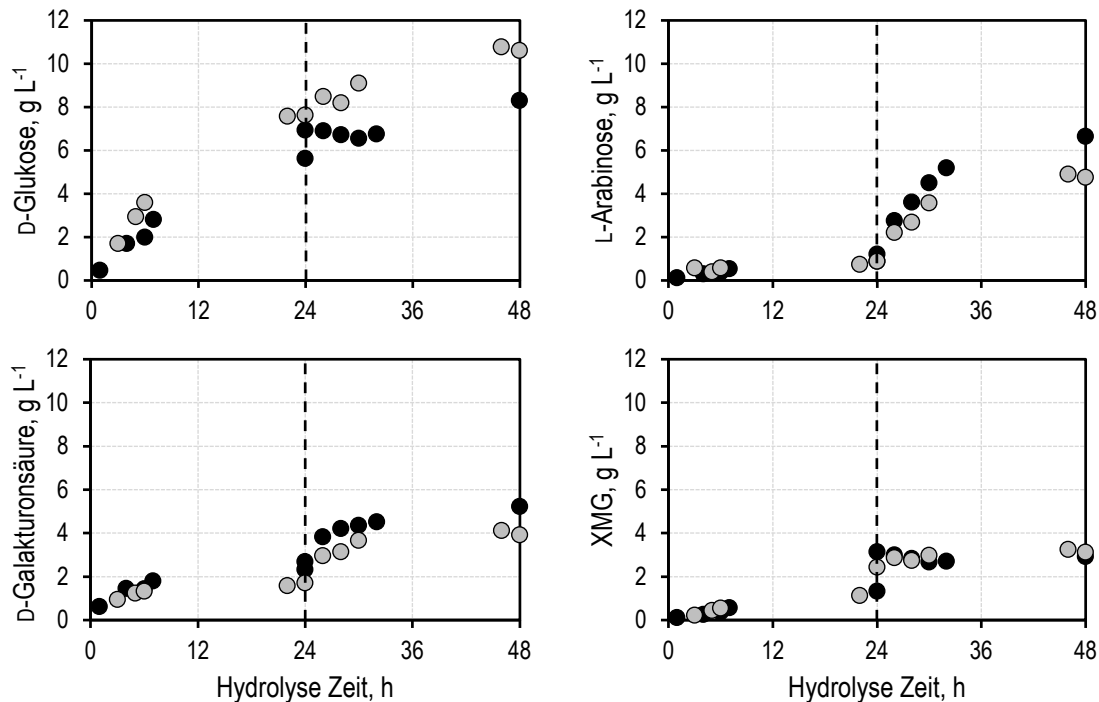


Abbildung 5.9: Enzymatische Hydrolyse von gemahlene Zuckerrübenpressschnitzeln nach Enzymproduktion mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im integrierten Prozess (Enzymherstellung und Hydrolyse): Konzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) im ersten (schwarz) und zweiten (grau) Ansatz. Die hydrolytischen Enzyme wurden von *A. niger* im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel produziert (Kapitel 5.2). Die gestrichelten Linien markieren die Zugabe von 51,14 g (schwarz) bzw. 205,6 g (grau) gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel nach 24 h. In beiden Ansätzen wurden die gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel vorab autoklaviert. Vor Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel betrug das Volumen der Flüssigphase 1,55 L und erhöhte sich anschließend auf 1,76 L (schwarz) bzw. 2,05 L (grau). ($T = 30^\circ \text{C}$, $n = 100 \text{ min}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$).

Die finalen Ausbeuten der Zuckermomere wurden anhand der zugegebenen Zuckerrübenpressschnitzel- und Wassermengen berechnet, wobei die während der ersten 24 h freigesetzten Zucker subtrahiert wurden.

Die resultierenden Zuckerausbeuten sind in Abbildung 5.10 dargestellt und zeigen Unterschiede zwischen den beiden Hydrolysen. Der Rückgang der D-Glukosekonzentration während der Hydrolyse im ersten Ansatz führte zu geringeren finalen Ausbeuten von 36,2 % im Vergleich zu 41,8 % im zweiten Ansatz. In den übrigen Zuckerfraktionen zeigte der erste Ansatz hingegen höhere Ausbeuten: 39,6 % D-Galakturonsäure, 55,1 % XMG und 79,6 % L-Arabinose. Im zweiten Ansatz, der mit einer höheren Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabemenge und Verdünnung durchgeführt

wurde, lagen die Ausbeuten bei 31,4 % D-Galakturonsäure, 25,2 % XMG und 55,5 % L-Arabinose.

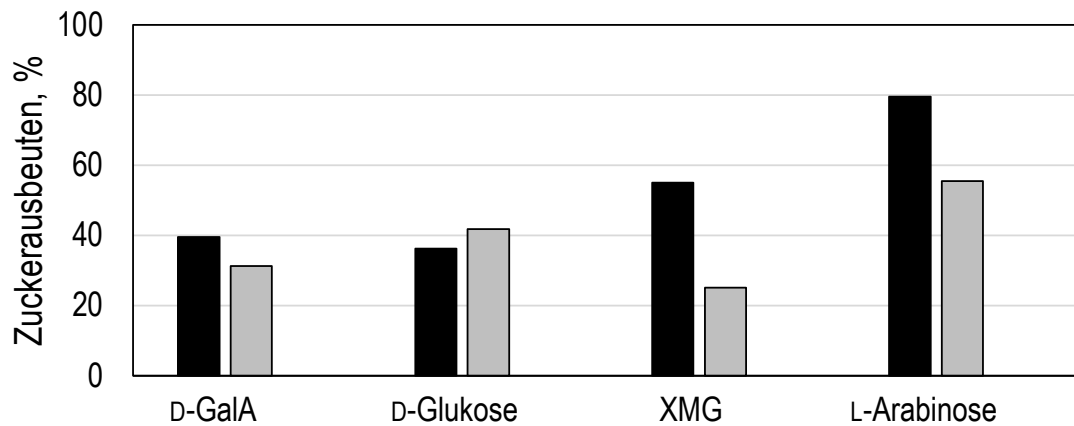


Abbildung 5.10: Enzymatische Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln nach Enzymproduktion mit *A. niger* ATCC 11414 Δ *gaaX* im integrierten Prozess (Enzymherstellung und Hydrolyse): Zuckerausbeuten nach 48 h Hydrolyse von D-Galakturonsäure (D-GalA), D-Glucose, D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) und L-Arabinose im ersten (schwarz) und zweiten (grau) Ansatz. Nach der Enzymherstellung von *A. niger* im feuchten Haufwerk mit nicht gemahlenen Zuckerrübenschnitzeln wurden zuerst die verbliebenen Zuckerrübenpressschnitzel-Reste durch die Zugabe von 980 mL Wasser hydrolysiert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 51,4 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln und 205,6 mL Wasser (schwarz) bzw. 60 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln mit 500 mL Wasser (grau). In beiden Ansätzen wurden die gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln vorab autoklaviert. ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 100\text{ min}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$).

Zusätzlich wurden die PGase-Aktivitäten während des Prozesses bestimmt. Im ersten Ansatz betrug die Enzymaktivität nach 32 h Hydrolyse $110,5 \pm 12,5\text{ U g}^{-1}$. Im zweiten Ansatz lag die Aktivität nach 24 h bei $169,5 \pm 7,8\text{ U g}^{-1}$ direkt vor der Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe und nach 48 h waren noch $165,9 \pm 14,1\text{ U g}^{-1}$ vorhanden. Die initialen PGase-Aktivitäten direkt nach Zugabe von Wasser (siehe Kapitel 5.2) waren im Vergleich bei $128,9 \pm 17,4\text{ U g}^{-1}$ im ersten und $141,1 \pm 29,8\text{ U g}^{-1}$ im zweiten Ansatz. Während die PGase-Aktivität im ersten Prozess weitgehend konstant blieb, nahm sie im zweiten Prozess zunächst zu und blieb anschließend relativ konstant.

Diskussion

Diese Satzversuche zeigten, dass ein integriertes Verfahren zur Enzymherstellung mit *A. niger* im feuchten Haufwerk und enzymatischer Hydrolyse möglich ist.

Die Temperaturerhöhung zu Beginn der Hydrolyse diente der Inaktivierung von *A. niger*. Dennoch zeigte sich im ersten Ansatz nach der Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel eine Abnahme der D-Glucose und XMG-Konzentrationen. Dies könnte auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen. *A. niger* weist eine optimale Wachstumstemperatur von $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf, kann jedoch in einem

Temperaturbereich von 6 °C bis 47 °C wachsen (Schuster et al., 2002). Im zweiten Ansatz trat keine Abnahme der D-Glukose- und XMG-Konzentrationen auf.

Die hier erzielten Zuckerausbeuten waren im Vergleich zu einer enzymatischen Hydrolyse mit Enzymen aus einer Suspension mit Zuckerrübenpressschnitzel geringer. In dieser Vergleichsstudie wurden nach 71 h Hydrolyse bei 50 °C und einer Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentration von 75 g L⁻¹ folgende Ausbeuten erzielt: 69 % D-Galakturonsäure, 84 % D-Glukose, 89 % XMG und 84 % L-Arabinose (Schäfer, 2022). In der Literatur werden Zuckerausbeuten durch enzymatische Hydrolyse zwischen 40 % und 80 % beschrieben (Kracher et al., 2014). Das weist darauf hin, dass beim integrierten Prozess noch Optimierungspotenzial für die enzymatische Hydrolyse besteht.

Die ermittelten PGase-Aktivitäten belegen die langfristige Stabilität der Enzyme bei 40 °C. Laut Literatur beträgt die Halbwertszeit von PGasen aus *A. niger* 276 h bei 55 °C (Pili et al., 2015).

Für eine nachfolgende technische Nutzung des Hydrolysats sind höhere Gesamtzuckerkonzentrationen erforderlich, weshalb weitere Prozessverbesserungen notwendig sind. Eine zentrale Herausforderung bestand in der Homogenisierung der Zuckerrübenpressschnitzel nach der Enzymherstellung im feuchten Haufwerk. Die Rührerdrehzahl von 100 min⁻¹ war zu niedrig, um die Zuckerrübenpressschnitzel aus dem durch das *A. niger*-Myzel entstandenen Substratverbund direkt zu lösen.

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit besteht in der Reduzierung der Zuckerrübenpressschnitzel-Menge während der Feststofffermentation, um anteilig mehr Platz im Bioreaktor für die nachfolgende Hydrolyse zur Verfügung zu haben. Dies könnte zu einer Erhöhung der Zuckerkonzentrationen im Hydrolysat und somit zu einer besser nutzbaren Zuckerlösung führen.

5.4. Integrierter Prozess in einem Bioreaktor

Zur Erhöhung der absoluten Zuckermenge im Hydrolysat wurde die Füllhöhe zur Enzymherstellung im feuchten Haufwerk auf 5 cm reduziert, sodass zur anschließenden Hydrolyse der Bioreaktor bis zum maximalen Betriebsvolumen gefüllt werden kann. Eine schematische Darstellung des integrierten Prozesses ist in Abbildung 5.11 dargestellt. Die Enzymherstellung wurde aufgrund der Sporenbildung nach 115 h (siehe Kapitel 5.2) auf 96 h verkürzt. Nach der Enzymherstellung erfolgte der Übergang zur Hydrolyse von

gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel in Suspension. Dazu wurde zunächst der Stoffwechsel von *A. niger* durch eine Temperaturerhöhung auf 50 °C und Stickstoffzugabe inaktiviert, sodass die durch die Hydrolyse freigesetzten Zucker nicht mehr verstoffwechselt werden. Zur Lösung der hydrolytischen Enzyme in der Wasserphase wurde zunächst steriles Wasser zugegeben und die Rührer eingeschaltet (220 min^{-1}). Diese Drehzahl erweist sich als geeignet, um die Zuckerrübenpressschnitzel aus dem bei der Enzymherstellung durch das *A. niger*-Myzel entstandenen Substratverbund zu lösen. Die Zugabe von gemahlenen sterilen Zuckerrübenpressschnitzeln erfolgte nach 24 h, um die Bestimmung von Zuckerausbeuten zu ermöglichen. Dabei wurde das maximal ermittelte Verhältnis von 220 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel zu 200 mL Wasser zur Herstellung der Suspension verwendet. Während der enzymatischen Hydrolyse wurde der pH auf 4,5 geregelt, basierend auf den Ergebnissen in Kapitel 5.3.1. Der pH von 4,5 wurde als Kompromiss gewählt, da dieser in einer früheren Studie als optimal für die *A. niger* PGasen bestimmt wurde (Schäfer, 2022).

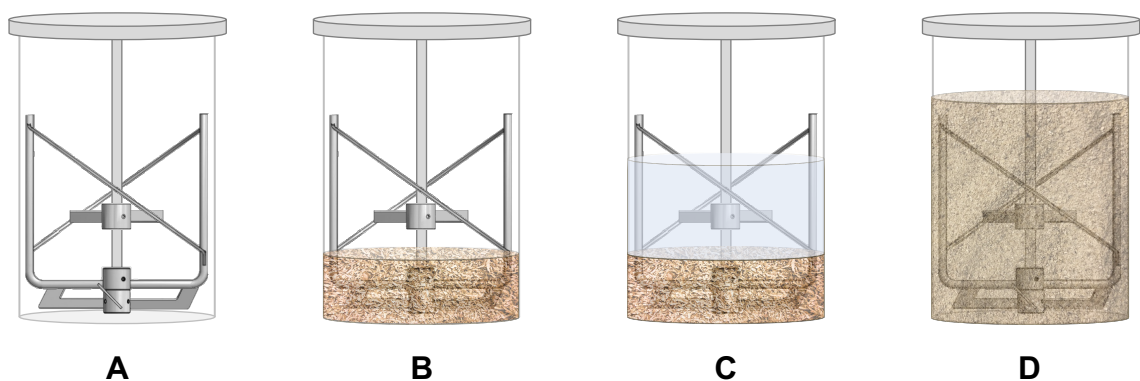


Abbildung 5.11: Prozessführung bei der Prozessintegration von Enzymherstellung mit *A. niger* im feuchten Haufwerk und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse in einem Rührkesselbioreaktor im Labormaßstab. (A) Konfiguration der Rührer von unten nach oben im Feststoffbioreaktor Ankerrührer, einfach Wendelrührer und Schrägblattrührer. (B) Zugabe von nicht gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln (Füllhöhe 5 cm) mit den fürs Wachstum notwendigen Zusatzstoffen und Inokulation mit *A. niger*-Sporen und Feststofffermentation für 96 h. ($T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $F_{\text{Luft}} = 1 \text{ L h}^{-1}$, $n = 0 \text{ min}^{-1}$). (C) Vor Beginn der Hydrolyse wurden 1,715 L steriles Wasser zugepumpt bis zu einer Füllhöhe von 12 cm, der Rührer gestartet (220 min^{-1}), die Temperatur auf 50 °C erhöht und der Bioreaktor mit Stickstoff gefüllt, um die Stoffwechselaktivität von *A. niger* zu inaktivieren. (D) Nach 24 h wurde die Hydrolyse durch Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln gestartet mit einem Füllstand von 17 cm (D).

Es wurden zwei Feststofffermentationen des genetisch modifizierten *A. niger*-Stammes mit 281 g L^{-1} nicht gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln durchgeführt. Das feuchte Haufwerk wurde mit $6,25 \times 10^6$ Sporen pro g Zuckerrübenpressschnitzel beimpft, manuell in einem Becherglas vermischt und anschließend über eine Öffnung im Deckel steril zugegeben. Diese Schritte zur Inokulation erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer

Sterilwerkbank (SWB Klasse 1, FAZ 3, WALDNER, Holding SE & Co. KG). Zur Kopfraumbegasung wurde sterile Luft verwendet. Die CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas wurden gemessen, um die Stoffwechselaktivität von *A. niger* zu überwachen und sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Die CO_2 -Konzentration im Abgas begannen nach etwa 24 h anzusteigen, während parallel die O_2 -Konzentrationen sanken. Die maximale Stoffwechselaktivität wurde zwischen 57 h und 62 h nach der Inokulation beobachtet. Nach 96 h waren die Stoffwechselaktivitäten in beiden Prozessen auf 50 % des Maximums reduziert.

Der RQ wurde basierend auf den CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas berechnet und ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung waren die RQ-Werte aufgrund starker Schwankungen nicht aussagekräftig, weshalb sie erst ab 24 h dargestellt sind. Die maximalen RQ-Werte von 1,2 und 1,1 traten nach etwa 36 h (schwarz) beziehungsweise 42 h (grau) auf. Nach etwa 65 h lagen die RQ-Werte bei etwa 1.

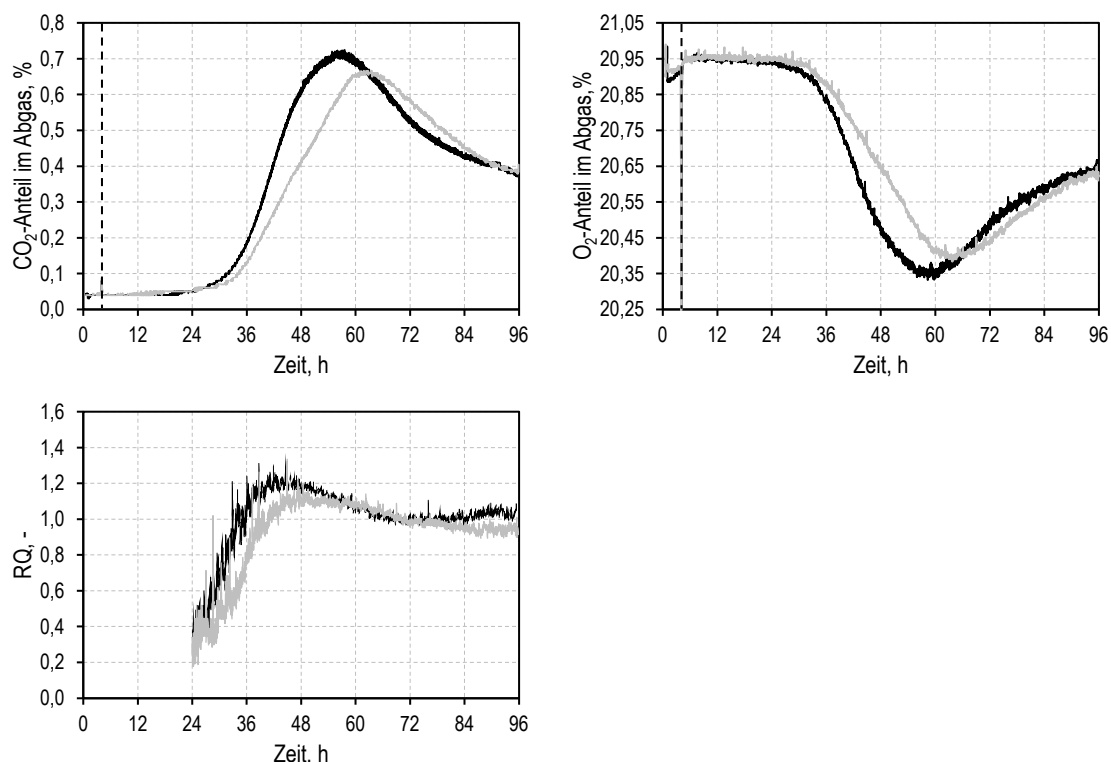


Abbildung 5.12: Enzymherstellung mit *A. niger* ATCC 11414 ΔgaaX im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel (Replikate): Verlauf der CO_2 - und O_2 -Konzentrationen sowie der Respirationsquotienten (RQ). Die schwarz gestrichelten Linien markieren den zeitversetzten Beginn der Begasung nach 4 h zur Vermeidung eines Sporenaustrags. Die Darstellung des RQ erfolgte nach 24 h. ($T = 30\text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1\text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $m_{\text{ZRPS}} = 80\text{ g}$, $V_F = 0,285\text{ L}$, $6,25 \times 10^6$ Sporen $\text{g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Die resultierenden PGase-Aktivitäten nach 96 h Enzymherstellung sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Die PGase-Aktivitäten betrugen $911,6 \pm 133,9 \text{ U g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel (schnellerer Prozess, gekennzeichnet durch die schwarzen Balken in Abbildung 5.13) und $747,5 \pm 15 \text{ U g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel. Nach 24 h Hydrolyse haben sich die Enzymaktivitäten auf $546,5 \pm 30,8 \text{ U g}^{-1}$ und $387,9 \pm 46,4 \text{ U g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel reduziert.

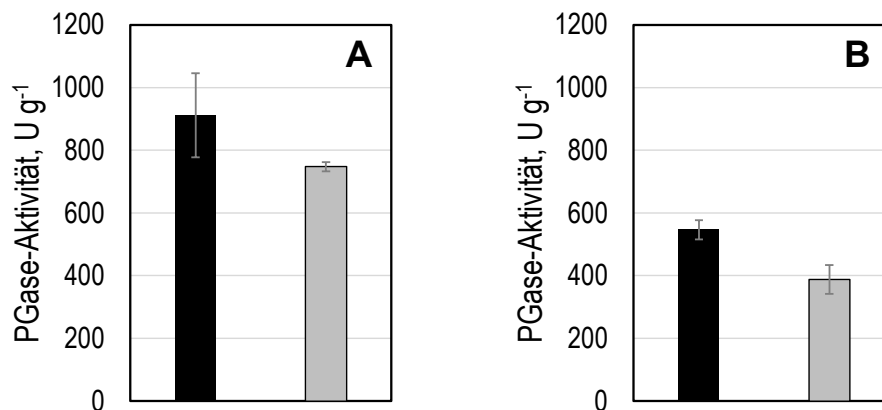


Abbildung 5.13: Enzymherstellung mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel (einfach reproduziert): Die ermittelten PGase-Aktivitäten (A) zu Beginn der Hydrolyse und nach (B) 24 h Hydrolyse vor der Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel. Nach der Enzymherstellung wurden jeweils 1,715 L steriles VE-Wasser zur Extraktion der Enzyme in den Bioreaktor gegeben und die Rührer gestartet (220 min^{-1}). Die PGase-Aktivitäten wurden in technischen Replikaten bestimmt. In schwarz ist der Prozess mit der höheren und in grau mit der niedrigeren metabolischen Aktivität (basierend auf den maximalen CO_2 -Konzentrationen im Abgas) dargestellt. ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $m_{\text{ZRPS}} = 80 \text{ g}$, $V_F = 2 \text{ L}$, $6,25 \times 10^6 \text{ Sporen g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$, $n = 220 \text{ min}^{-1}$).

Nach der Zugabe des sterilen Wassers, dem Beginn des Rührens bei einer Drehzahl von 220 min^{-1} , der Erhöhung der Temperatur auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und dem Anaerobisieren des Rührkesselbioreaktors mit Stickstoffgas zur Inaktivierung von *A. niger*, wurden mit 24 h Zeitversatz autoklavierte gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel für die Hydrolyse zugegeben. Die Biotrockenmassekonzentrationen (Zuckerrübenpressschnitzel und Pilzbiomasse) sind in Abbildung 5.14 in Abhängigkeit von der Hydrolysezeit dargestellt. Innerhalb der ersten 24 h wurde die verbleibende Trockenmassenkonzentration aus der Enzymherstellung von ungefähr 20 g L^{-1} auf 15 g L^{-1} reduziert. Die Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel nach 24 h führte zu einer Biotrockenmassekonzentration von etwa 119 g L^{-1} . Durch die enzymatische Hydrolyse wurden die Trockenmassekonzentrationen kontinuierlich, aber mit abnehmender Geschwindigkeit reduziert, und erreichten nach einer Hydrolysezeit von 166 h eine Endkonzentration von 54 g L^{-1} . Dies entspricht der enzymatischen Hydrolyse von etwa 48 % der zugegebenen gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel innerhalb von 142 h.

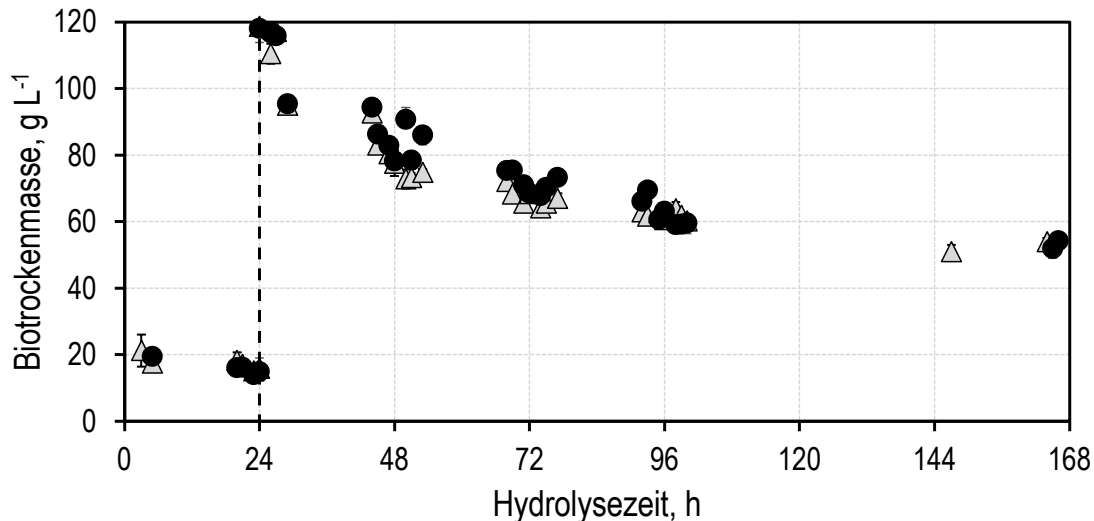


Abbildung 5.14: Enzymherstellung im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im Rührkesselreaktor und anschließende enzymatische Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel (einfach reproduziert): Biotrockenmassenkonzentrationen während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel. Die gestrichelte Linie markiert die Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel. ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Die Zuckerkonzentrationen im Hydrolyseüberstand sind in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Freisetzung aller Zucker war innerhalb der ersten 24 h vor der Zugabe des autoklavierten gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel abgeschlossen, mit Ausnahme von D-Glukose. Unmittelbar nach der Zugabe der gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel stiegen die D-Glukosekonzentrationen sowie die Summe der XMG-Konzentrationen sofort um einen Faktor von 1,68 beziehungsweise 5,06 an. Nach einer Hydrolysezeit von 166 h wurden Endkonzentrationen von 17 g L^{-1} D-Glukose, $18,8\text{ g L}^{-1}$ L-Arabinose, $12,5\text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure und $6,5\text{ g L}^{-1}$ XMG erreicht, was einer Gesamtzuckerkonzentration von $54,8\text{ g L}^{-1}$ entspricht.

Die Zuckerausbeuten während der Hydrolyse sind in Abbildung 5.16 als Funktion der Prozesszeit dargestellt. Die Ausbeuten wurden auf der Grundlage der Analyse der Zuckerrübenpressschnitzel-Zusammensetzung Tabelle 5.1 A (Abbildung 5.16 schwarz und grau) berechnet, wobei nur die nach 24 h zugegebenen, gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel und dementsprechend die freigesetzten Zuckermonomere nach der Zugabe berücksichtigt wurden. Die D-Glukoseausbeute und XMG-Ausbeute betrugen bereits etwa 20 % beziehungsweise 40 % direkt nach Zugabe der autoklavierten gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel. Die finale D-Glukoseausbeute nach 166 h betrug 98 %. Die finalen Ausbeuten der anderen Zuckermonomere nach 166 h betrugen 86 % L-Arabinose, 50 % D-Galakturonsäure und 71 – 75 % XMG.

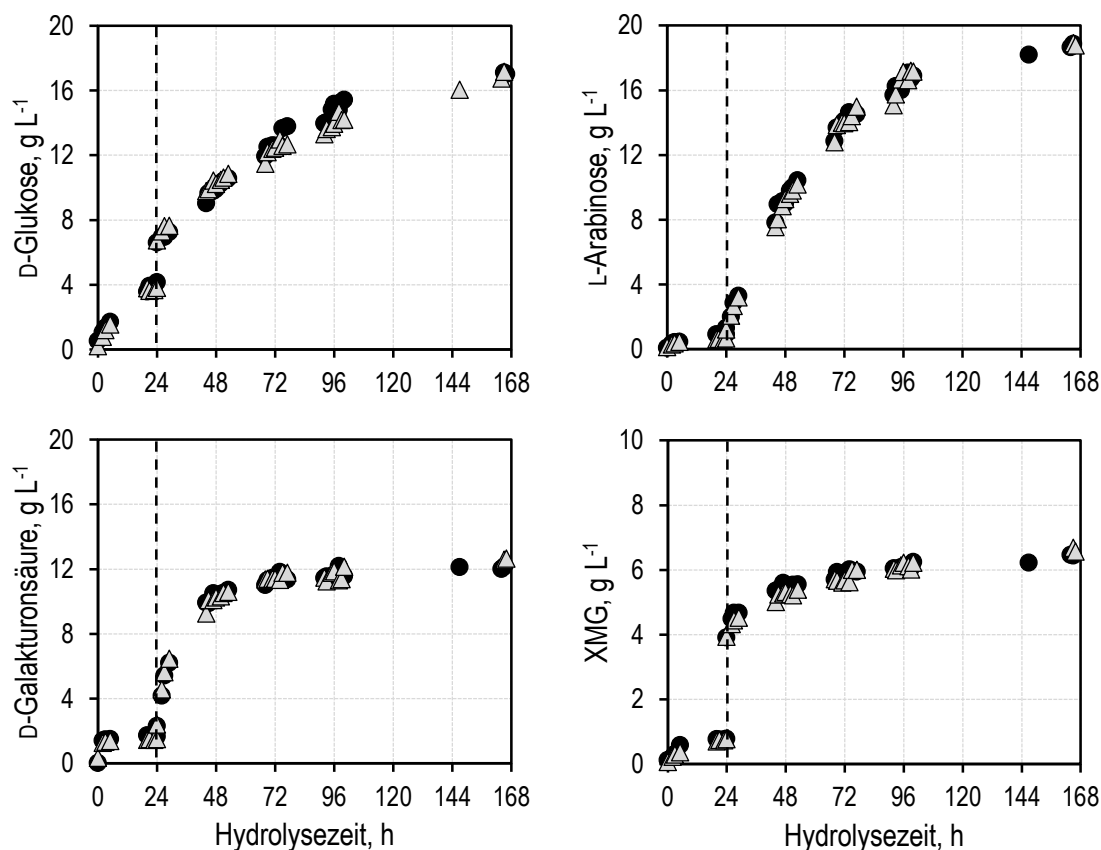


Abbildung 5.15: Zuckerkonzentrationen während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln nach der Enzymherstellung mit gentechnisch modifizierten *A. niger* im integrierten Verfahren (metabolisch schnellerer Prozess: Kreis Symbole): D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) Konzentrationen. Die Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzeln erfolgte nach 24 h (gestrichelte Linie). ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Alternativ wurden die Zuckerausbeuten bei der enzymatischen Hydrolyse basierend auf dem Durchschnitt der Literaturdaten in Tabelle 5.1 berechnet und sind ebenfalls in Abbildung 5.16 (rot und blau) dargestellt.

Tabelle 5.1: (A) Zusammensetzung der für die Hydrolyse verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel-Charge nach Knesebeck et al. (2023) (B) zu Mittelwert aus der Literatur nach Micard et al. (1994, 1996) und Rouau et al. (1987).

	Glu	D-GalA	Ara	Gal	Xyl	Man	Rha	Fuc	GluA	RM
A	13,6	21,8	21,6	6,9	1,2	0,5	6,8	0,2	0,3	28,5
B	22,0	19,9	20,6	5,1	1,6	1,3	1,9	0,1	0	22,7

* RM = Restmasse; (D-Glukose (Glu), D-Galakturonsäure (D-GalA), L-Arabinose (Ara), D-Galaktose (Gal), D-Xylose (Xyl), D-Mannose (Man), L-Rhamnose (Rha), D-Fucose (Fuc), D-Glucuronsäure (GluA))

Die dabei erhaltene D-Glukoseausbeute nach 166 h Hydrolyse beträgt 61 % und ist somit deutlich niedriger. Die finalen Ausbeuten der anderen Komponenten nach 166 h

Hydrolyse liegen bei 86 % L-Arabinose, 54 – 58 % D-Galakturonsäure und 71 – 75 % XMG. Die Ausbeuten dieser Komponenten waren somit vergleichbar zu den ursprünglichen Berechnungen und die D-Glukoseausbeute niedriger.

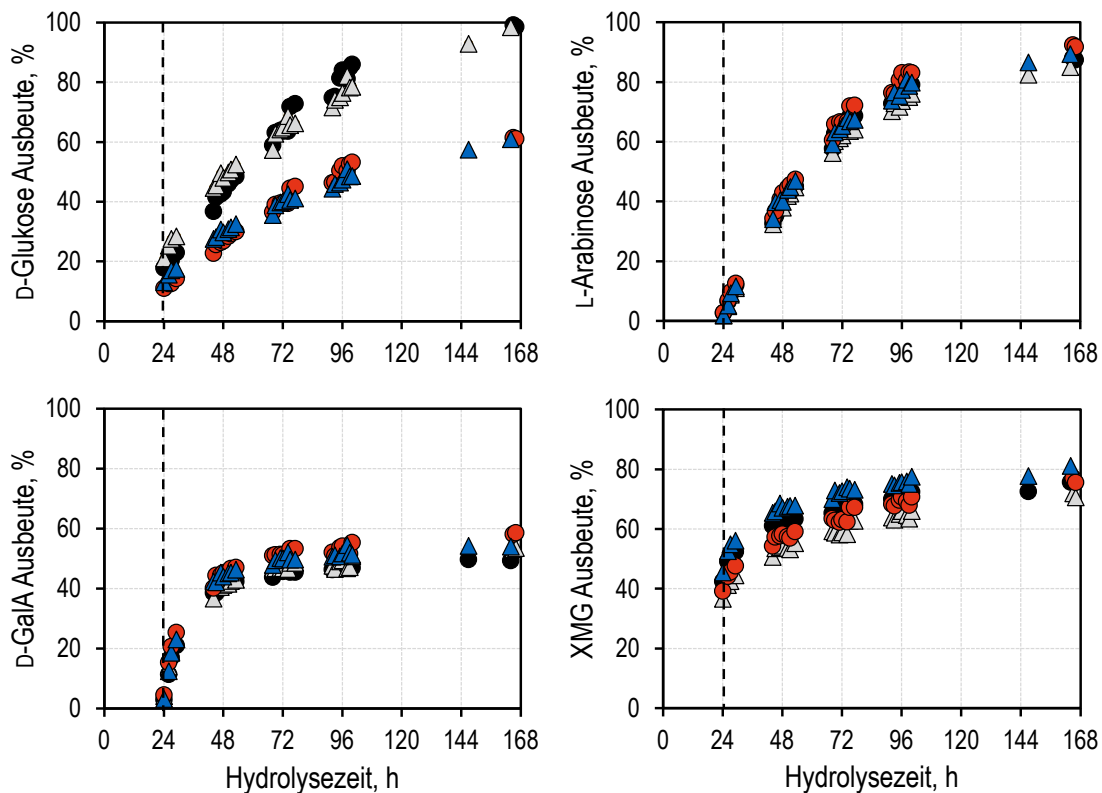


Abbildung 5.16: Zuckerausbeuten während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel nach Enzymherstellung mit gentechnisch modifizierten *A. niger* (metabolisch schnellerer Prozess: Kreis Symbole) im integrierten Verfahren. Die Zuckerausbeuten basieren auf der Zusammensetzungsanalyse der verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel-Charge (schwarz und grau, Tabelle 5.1 A) und durchschnittlichen Zusammensetzung von Zuckerrübenpressschnitzel in ausgewählter Literatur (rot und blau, Tabelle 5.1 B). Die Zugabe von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel erfolgte nach 24 h (gestrichelte Linie). D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) Ausbeute. ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Anschließend wurde ein integrierter Prozess ohne 24 h Wartezeit für die Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe durchgeführt. Zur Berechnung der Ausbeuten aus den zugegebenen gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel wurden die durchschnittlich freigesetzte Zuckermenge nach 24 h von den vorherigen Prozessen abgezogen, um die Anteile aus der Enzymproduktion stammender Zucker zu berücksichtigen.

Die CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas während der Enzymproduktion im feuchten Haufwerk mit *A. niger* sind in Abbildung 5.17 dargestellt. In diesem Versuch (grün) wurde die maximale metabolische Aktivität nach 48 h erreicht und lag mit etwa 0,73 % CO_2 etwas höher als in den vorherigen Versuchen (schwarz, grau). Die finale CO_2 -Konzentration nach 96 h betrug 0,35 %, was etwa der Hälfte des maximalen Wertes

entspricht. Die O_2 -Konzentrationen zeigten einen inversen Verlauf zu den CO_2 -Konzentrationen.

Zu Beginn der Kultivierung waren die RQ-Werte aufgrund starker Schwankungen nicht aussagekräftig, weshalb sie erst ab 24 h dargestellt sind (siehe Abbildung 5.17). In diesem Versuch (grün) wurde der maximale RQ-Werte von 1,2 nach 46 h erreicht. Anschließend sank der RQ-Wert und war nach 72 h konstant bei etwa 1.

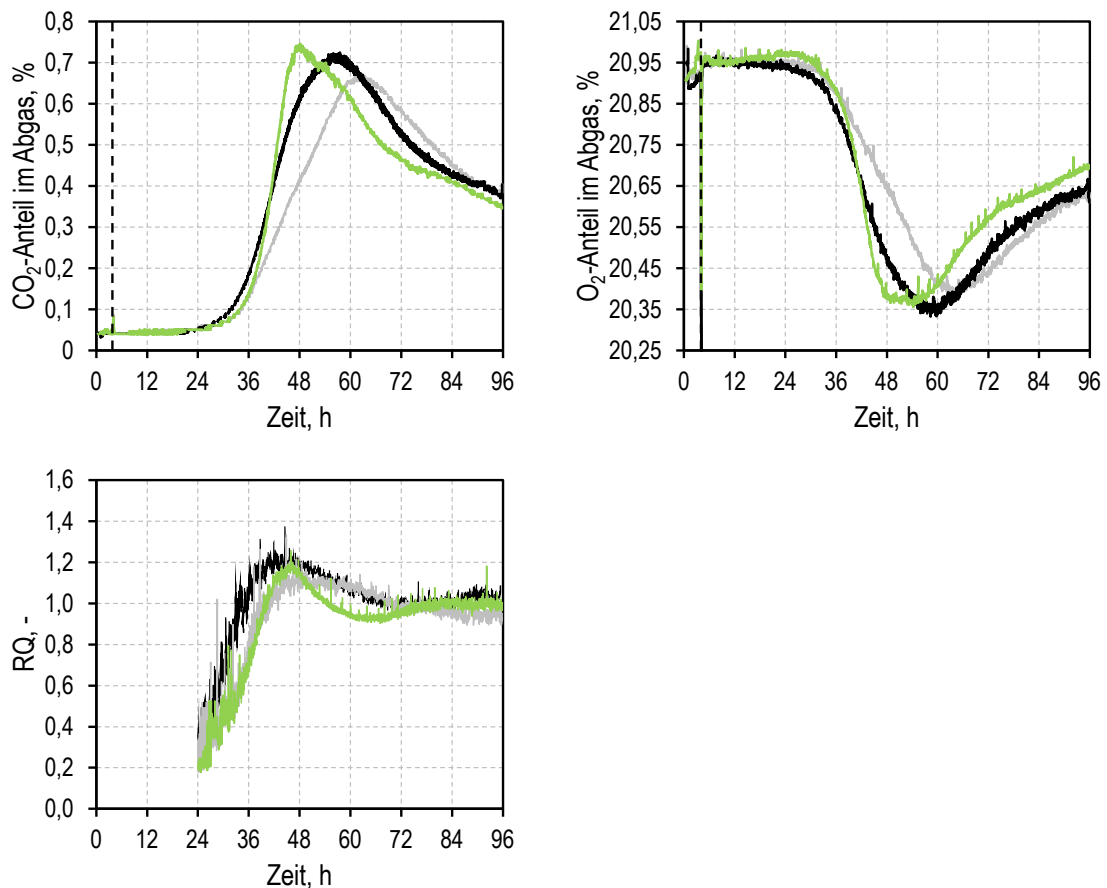


Abbildung 5.17: Enzymherstellung mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel im integrierten Prozess: Verlauf der CO_2 - und O_2 -Konzentrationen sowie der Respirationsquotienten (RQ). Die Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe im nachfolgenden Prozessschritt erfolgte direkt zu Beginn (grün) oder nach 24 h Hydrolyse (schwarz und grau). Die schwarz gestrichelten Linien markieren den zeitversetzten Beginn der Begasung nach 4 h zur Vermeidung eines Sporenaustrags. Die Darstellung des RQ erfolgte nach 24 h. ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 1\text{ L h}^{-1}$, $pH_0 = 4,5$, $m_{\text{ZRPS}} = 80\text{ g}$, $V_F = 0,285\text{ L}$, $6,25 \times 10^6$ Sporen $\text{g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Abbildung 5.18 zeigt die Biotrockenmassekonzentrationen bei der Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel. Nach Zugabe der gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel stieg die Biotrockenmassekonzentration sprunghaft auf etwa 112 g L^{-1} an, wobei die initiale Konzentration leicht unter der der vorherigen Hydrolyseprozessen (schwarz, grau) lag.

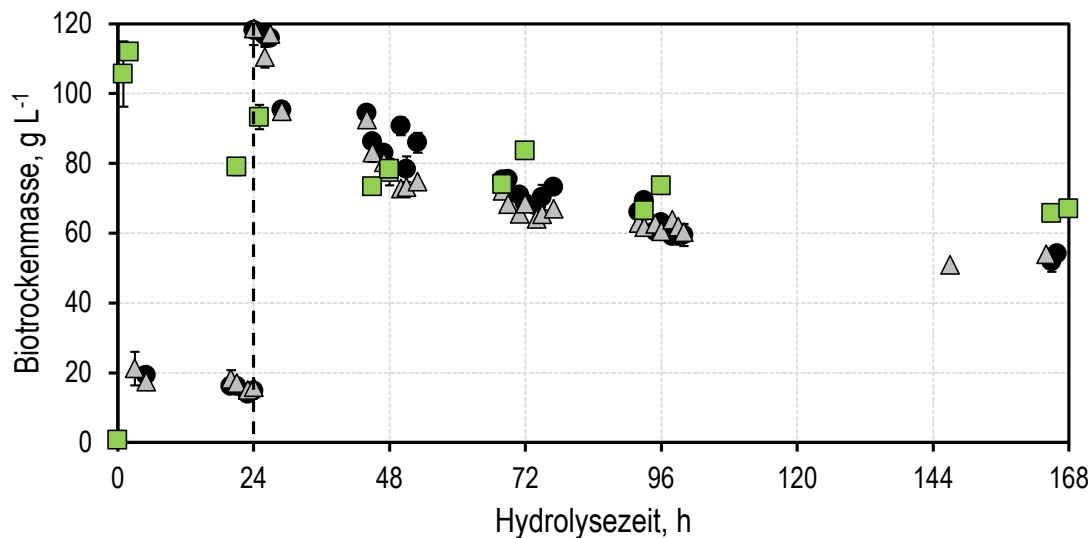


Abbildung 5.18: Enzymherstellung im feuchten Haufwerk mit Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 Δ *gaaX* im Rührkesselreaktor und anschließende enzymatische Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel: Biotrockenmassekonzentrationen während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel. Die gestrichelte Linie markiert die zeitversetzte Zugabe von 220 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel im Prozess (schwarz, grau), während bei dem Satzprozess (grün) die Zuckerrübenpressschnitzel direkt zu Beginn der Hydrolyse zugegeben wurden. ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Durch die enzymatische Hydrolyse nahm die Biotrockenmassekonzentrationen kontinuierlich ab und erreichte nach 166 h eine Endkonzentration von 67 g L^{-1} . Dies entspricht einer gesamten enzymatischen Hydrolyse von etwa 40 % der zugegebenen Zuckerrübenpressschnitzel. Wird der Anteil der aus der Fermentation verbliebenen Zuckerrübenpressschnitzel von etwa 15 g L^{-1} abgezogen ergibt sich eine enzymatische Hydrolyse von 46 % der zugegebenen Zuckerrübenpressschnitzel. Die Reduktion der Biotrockenmasse war hier im Vergleich zu den beiden vorherigen Prozessen leicht verringert.

In Abbildung 5.19 sind die Zuckerkonzentrationen im Überstand der Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse dargestellt. Die Endkonzentrationen von L-Arabinose und XMG blieben unverändert, jedoch wurde die Sättigung früher erreicht. Die D-Glukosefreisetzung aus den Zuckerrübenpressschnitzel erfolgte langsamer und die finale D-Glukosekonzentration war mit $12,9\text{ g L}^{-1}$ niedriger. Die Endkonzentration von $15,8\text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure war höher, mit einem steileren Anstieg, wobei die Sättigung bereits nach 48 Stunden erreicht wurde – etwa 24 Stunden früher als in den vorherigen Versuchen.

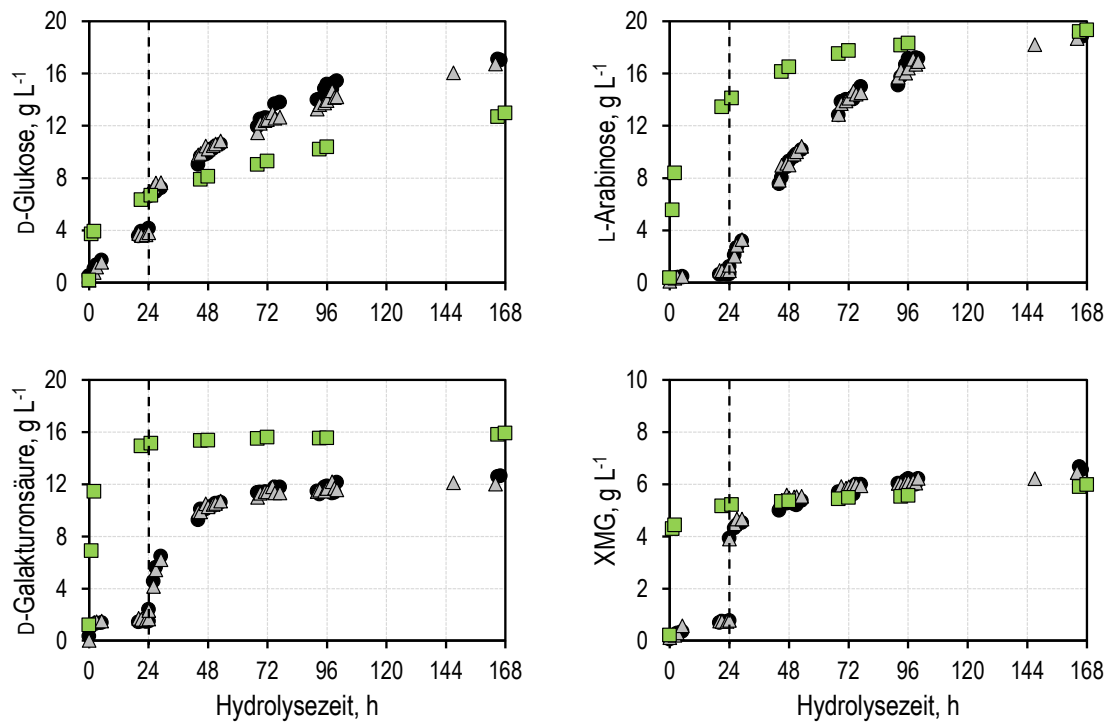


Abbildung 5.19: Zuckerkonzentrationen während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel nach Enzymherstellung mit *A. niger* ATCC 11414 Δ *gaaX* im integrierten Verfahren: D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) Konzentrationen. Die gestrichelte Linie markiert die zeitversetzte Zugabe von 220 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel im Prozess (schwarz, grau), während bei dem Satzprozess (grün) die Zuckerrübenpressschnitzel direkt zu Beginn der Hydrolyse zugegeben wurden. ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Abbildung 5.20 zeigt die berechneten Ausbeuten, wobei beim grün dargestellten Prozess, ohne 24 h Wartezeit zu Beginn, die freigesetzten Zucker aus der Enzymherstellung abgezogen wurden. Die Ausbeuten von L-Arabinose (80 %) und XMG (63 %) waren im Verlauf ähnlich, jedoch final etwa 5 – 10 % niedriger als in den vorherigen Prozessen. Die D-Glukoseausbeute lag mit 53 % etwa 8 % niedriger, während die D-Galakturonsäure-Ausbeute mit 66 % um etwa 15 % erhöht war.

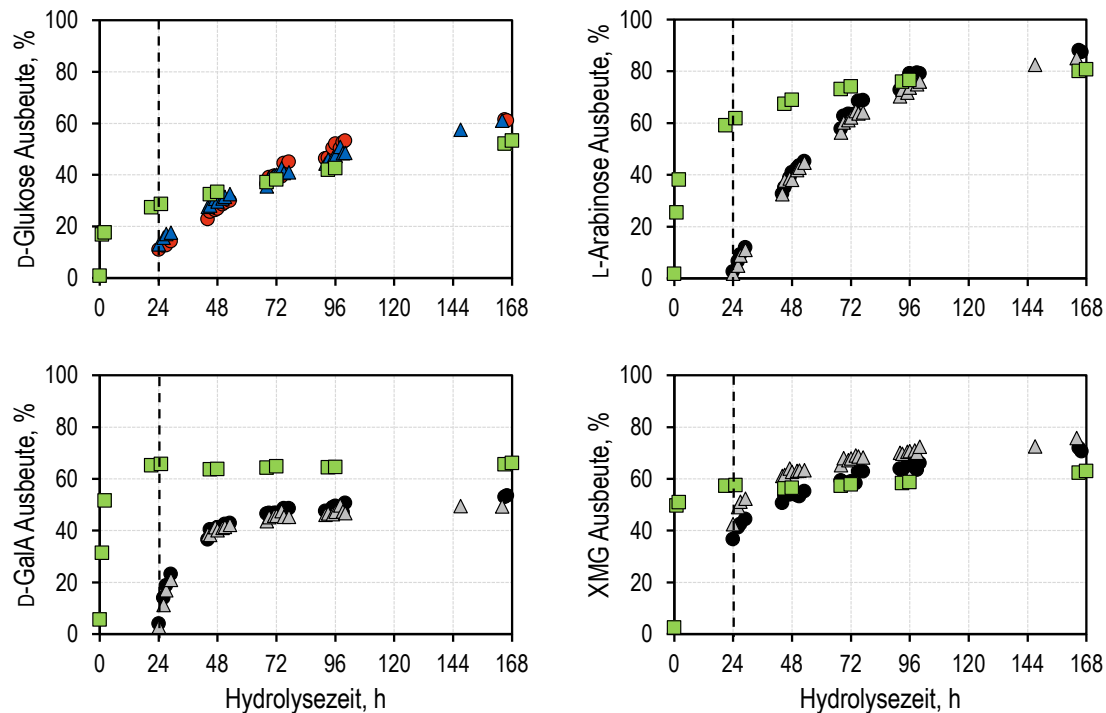


Abbildung 5.20: Zuckerausbeuten während der Hydrolyse von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel nach Enzymherstellung mit *A. niger* ATCC 11414 Δ gaaX (metabolisch schnellerer Prozess: Kreis Symbole) im integrierten Verfahren: D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) Ausbeuten. Die gestrichelte Linie markiert die zeitversetzte Zugabe von 220 g gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel im Prozess (schwarz, grau, rot, blau), während bei dem Satzprozess (grün) die Zuckerrübenpressschnitzel direkt zu Beginn der Hydrolyse zugegeben wurden. Die Ausbeute der D-Glukose basiert auf den durchschnittlichen Anteil von D-Glukose in Zuckerrübenpressschnitzel in ausgewählter Literatur (Tabelle 5.1 B) und von den restlichen Zuckern auf der Zusammensetzungsanalyse der verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel-Charge (Tabelle 5.1 A). ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 220\text{ min}^{-1}$).

Diskussion

RQ-Werte über 1 deuten auf eine hohe Verfügbarkeit leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen hin (Dilly, 2001, 2003, 2004). Dies war zu Beginn der Satzprozesse bis etwa 60 h der Fall. Anschließend war bei allen drei Satzprozessen ein Gleichgewicht von CO_2 -Produktion zur O_2 -Verbrauch vorhanden, was typisch für eine vollständige aerobe Atmung von beispielsweise D-Glukose ist (Dilly, 2001; Takors & Weuster-Botz, 2018).

Die nach der Enzymherstellung mit *A. niger* im feuchten Haufwerk erreichten PGase-Aktivitäten sind niedriger im Vergleich zu Enzymherstellung desselben *A. niger*-Stamms mit 30 g L^{-1} Suspendierten gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel im Rührkesselreaktor, wo nach 83 h eine PGase-Aktivität von $146,23 \pm 10,67\text{ U mL}^{-1}$ in Suspension (entspricht $4874,3 \pm 355,7\text{ U g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel) erreicht wurde (Schäfer, 2022). Die Effekte der ständigen Adsorption, Desorption und Re-Adsorption

der Enzyme auf das Substrat während der Hydrolyse müssen hierbei jedoch berücksichtigt werden (Thoresen et al., 2022; Zhang et al., 2021). Bei der Enzymproduktion im feuchten Haufwerk nimmt aufgrund des erhöhten Feststoffgehalts die Anzahl der an das Substrat gebundenen Enzyme zu, wodurch diese möglicherweise nicht mehr in der flüssigen Phase für den enzymatischen Nachweis verfügbar sind. In einer weiteren Studie wurde bei einer Feststofffermentation im feuchten Haufwerk mit 10 g Soja- und Weizenkleie und einem Feuchtigkeitsgehalt von 40 % (w/w) mit *A. niger* eine PGase-Aktivität von etwa 135 U g⁻¹ Substrat nach 70 h erzielt. Bei diesem Versuch wurden die Enzyme durch Zugabe von 50 mL Puffer extrahiert (Castilho et al., 2000).

Die Prozessdaten Biotrockenmassekonzentrationen während der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel zeigten einen vergleichbaren Verlauf. Unterschiede können auf biologische Variabilität zurückzuführen sein.

Die erhöhte Rührerdrehzahl (220 min⁻¹) führte zu einer effizienten Homogenisierung der Zuckerrübenpressschnitzel und zu höheren Ausbeuten im Vergleich zu Kapitel 5.3.2. Höhere Rührerdrehzahlen korrelieren mit einer verbesserten Verteilung der Partikel, was sich auf die enzymatische Umsatzrate auswirkt (Rezić et al., 2013). Zudem begünstigt die erhöhte Scherrate eine mechanische Zerkleinerung der Partikel und in Kombination mit der enzymatischen Hydrolyse führt das zu verbesserten Ausbeuten (Palmqvist et al., 2011).

Beim Vergleich der Zuckerkonzentrationen wurden für L-Arabinose und XMG ähnliche finale Werte in allen drei Satzprozessen beobachtet. Dahingegen war im Satzprozess mit direkter Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe ohne 24 h Wartezeit die finale D-Galakturonsäure-Konzentration höher und D-Glukosekonzentration geringer. In diesem Prozess wiesen Cellulasen eine geringere Enzymaktivität auf, deren Ursache derzeit nicht geklärt ist. Es ist möglich, dass die höheren D-Glukosekonzentrationen bei direkter Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel zur Hemmung der Cellulasen führten. Laut Literatur tritt eine reduzierte *A. niger*-Cellulasen Aktivität jedoch erst ab einer D-Glukosekonzentration von 30 g L⁻¹ auf (Ma et al., 2022).

Bei den Satzprozessen mit Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe nach 24 h wurde für D-Galakturonsäure mit 50 % die geringste Ausbeute nach 166 h Hydrolyse verzeichnet, obwohl der gentechnisch modifizierte *A. niger*-Stamm mit erhöhter PGase-Aktivität zur Enzymproduktion eingesetzt wurde. Die PGase-Aktivitäten verringerte sich innerhalb der ersten 24 h Hydrolyse auf 546,5 ± 30,8 U g⁻¹ (schwarzen Symbole in den Abbildungen 5.12 – 5.20) und 387,9 ± 46,4 U g⁻¹ (graue Symbole in den Abbildungen 5.12 – 5.20), was einer Reduzierung auf 60 % und 51,9 % der ursprünglichen Aktivität entspricht. Im

Gegensatz dazu waren die Konzentrationen und Ausbeuten von D-Galakturonsäure im Satzprozess mit direkter Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe mit 66 % erhöht. Die Konzentrationen steigen im Vergleich deutlich stärker an und erreichten nach 24 h ein Sättigungsniveau. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der PGasen rasch abnimmt. Eine andere Studie erzielte nach 162 h Hydrolyse, mit ebenfalls direkter Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel, ähnliche D-Galakturonsäure-Ausbeuten von 67 % (Schäfer, 2022). Es scheint, dass diese Abnahme der Enzymaktivität innerhalb von 24 h bei 50 °C vor der Zugabe der gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel der Grund für die geringere D-Galakturonsäure-Ausbeute bei versetzter Zuckerrübenpressschnitzel Zugabe sein könnte, obwohl für die von *A. niger* sekretierten PGasen ein Temperaturoptimum von 50 °C und einer Halbwertszeit von 276 h bei 55 °C ermittelt wurde (Niu et al., 2016). Eine mögliche Erklärung wäre, dass der hier verwendete *A. niger*-Stamm eine andere Zusammensetzung an hydrolytischen Enzymen sekretiert hat und diese weniger temperaturstabil sind im Vergleich zur Literatur.

Die unmittelbare Zunahme der D-Glukosekonzentration sowie die der XMG-Konzentrationen direkt nach Zugabe der gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel erfolgte aufgrund einer Teilhydrolyse während der thermischen Sterilisation der Zuckerrübenpressschnitzel vor der Zugabe. Diese Vorbehandlung war zur Vermeidung von Kontaminationen notwendig. Die Freisetzungsraten der Zuckermonomere waren nach 166 h Hydrolyse nur für D-Galakturonsäure und zusätzlich beim Satzprozess mit direkter Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe für XMG konstant. Dies deutet darauf hin, dass durch eine Verlängerung der Hydrolysezeit höhere Zuckerkonzentrationen erzielt werden könnten.

Die finalen Ausbeuten von D-Glukose betrugen am Ende der Hydrolyse bei den Prozessen mit Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe nach 24 h 98 %. Die Ausbeuten hatte zu diesem Zeitpunkt kein Sättigungsniveau erreicht. Eine Ursache könnte die zusätzliche Freisetzung von D-Glukose aus den Zuckerrübenpressschnitzel sein, die bei der vorherigen Enzymherstellung nicht vollständig verbraucht wurden. Zu Beginn der Hydrolyse waren noch Trockenmassekonzentrationen von 15 g L⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel aus der Enzymherstellung übrig, die während der Hydrolyse enzymatisch zersetzt werden könnten (siehe Abbildung 5.14).

Eine weitere Ursache könnte ein unterschätzter D-Glukosegehalt der verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel sein. Die Berechnung der Zuckerausbeute der Zucker erfolgte zunächst aus den ermittelten Anteilen der jeweiligen Zucker der verwendeten Zuckerrübenpressschnitzel-Charge, die in Tabelle 5.1 aufgelistet sind. Die Unterschiede der Anteile im Vergleich zum Mittelwert der Literatur (Tabelle 5.1 B) sind teilweise auf

biologische Varianz der Zuckerrübenpressschnitzel zurückzuführen, da die Zusammensetzung auch von den Anbaubedingungen der Zuckerrüben abhängig ist (Hoffmann et al., 2009). Zudem variieren auch die Methoden der Zuckerrübenpressschnitzel-Analyse. In den D-Glukose und L-Rhamnose-Fractionen zeigten sich deutliche Unterschiede an dem prozentualen Anteil in Zuckerrübenpressschnitzel.

Die mit diesem integrierten Verfahren von Enzymherstellung und Hydrolyse erzielten Zuckerausbeuten sind mit den Literaturdaten zu Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyseverfahren mit Kombinationen handelsüblicher konzentrierter Enzyme vergleichbar. So wurde beispielsweise mit einer Multienzymkombination aus Pilzcellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen bei anfänglichen Zuckerrübenpressschnitzel-Konzentrationen von $100 - 250 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 48 h eine L-Arabinoseausbeute von 94 % und eine D-Glukoseausbeute von 63 – 79 % erzielt (Semenova et al., 2019).

In den Satzprozessen mit Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe nach 24 h liegt die Gesamtzuckerausbeute bei 66,5 %, ausgehend von einem D-Glukoseanteil von 22 % in den Pressschnitzeln (siehe Tabelle 5.1 B). Bei der enzymatischen Hydrolyse von $6,7 \text{ g L}^{-1}$ Weizenstroh mit einer Cellulase-Lösung (pH 4,8, 45 °C, 72 h) ohne Vorbehandlung wurde eine Gesamtzuckerausbeute von 9,1 % erzielt. Eine chemische Vorbehandlung mit Natriumhydroxid und Ethylenglykol (Verhältnis 1:4) für 5 h bei 90 °C mit einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse für 72 h führte im Gegensatz dazu zu einer deutlich erhöhten Zuckerausbeuten von 81,6 %. (Zhao et al., 2023) Es liegt nahe, dass eine geeignete Vorbehandlung von Zuckerrübenpressschnitzeln die hydrolytische Effizienz als auch die Gesamtzuckerausbeute im integrierten Verfahren steigern könnte.

Die enzymatische Hydrolyse 100 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel ohne Vorbehandlung mit Enzymen von *Penicillium verruculosum* von bei 50 °C und pH 5 ergab nach 48 h eine Gesamtzuckerkonzentration von 36 g L^{-1} , was unter dem im integrierten Verfahren erzielten Wert von $54,8 \text{ g L}^{-1}$ liegt (Komarova et al., 2025).

Die Wasserverdampfung zur Aufkonzentrierung des Zuckers im Hydrolysat ist häufig wirtschaftlich nicht sinnvoll. Mögliche freigesetzte inhibierende Komponenten aus lignocellulosehaltigen pflanzlichen Reststoffen würden hierbei die Konzentration ebenfalls erhöht werden, was eine Nutzung in nachfolgenden Fermentationsprozessen erschweren könnte (Fernandes et al., 2023; Kühnel et al., 2011; Rafiqul et al., 2014) . Die vollständige Umwandlung von Einfachzuckermonomeren in höherwertige Produkte ist daher für die wirtschaftliche Verwertung von Hydrolysaten unumgänglich.

Beispielsweise wird die hier gezeigte Erhöhung der D-Galakturonsäure-Konzentration auf $15,8 \text{ g L}^{-1}$ die Endkonzentration des höherwertigen Produkts L-Galaktonat verbessern, das mit Hilfe von gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae* mit hohen Ausbeuten in einem konsekutiven Biotransformationsprozess hergestellt werden kann (Harth et al., 2020; Wagner et al., 2021).

Zusammenfassend war die direkte Zugabe von Zuckerrübenpressschnitzel vorteilhaft. Die Gesamtzuckerkonzentration nach 170 h betrug $53,9 \text{ g L}^{-1}$. Insbesondere die Konzentrationen von D-Galakturonsäure und L-Arabinose stiegen rascher an, sodass eine Verkürzung der Hydrolysedauer auf 72 h möglich wäre mit einer resultierenden Gesamtzuckerkonzentration von $48,1 \text{ g L}^{-1}$. Zum Vergleich lag der Mittelwert der beiden vorherigen Prozesse nach 72 h bei $43,8 \text{ g L}^{-1}$.

6. Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol²

Zunächst erfolgt die Charakterisierung rekombinanter *A. niger*-Stämme mit synthetischem Medium. Diese Stämme wurden vom Projektpartner von der Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft (Technische Universität München, Prof. J. Philipp Benz) bereitgestellt und weisen genetische Deletionen von Enzymen des L-Arabinose-Stoffwechselwegs von *A. niger* auf. Anschließend werden Verfahren zur Vermeidung der D-Xylitol-Metabolisierung in Satzverfahren durchgeführt. Abschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse zusammengeführt und der am besten geeignete *A. niger*-Stamm mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat kultiviert.

6.1. Charakterisierung von *A. niger*-Stämmen zur D-Xylitolproduktion

Zur Charakterisierung zwei gentechnisch modifizierter *A. niger*-Stämme zur D-Xylitolproduktion im Rührkesselreaktor wurden Satzprozesse durchgeführt. Diese Stämme basieren auf *A. niger* NRRL3 und enthalten gezielte Knock-out-Mutationen im Pentose-Katabolismus von L-Arabinose. Der *A. niger* NRRL3 Stamm wies bei einer vergleichenden Untersuchung die höchste native α -L-Arabinofuranosidase- und endo-Arabinase-Aktivität auf, was bei der Nutzung arabinanhaltiger Rohstoffe für die D-Xylitolproduktion vorteilhaft ist (Rüllke, Schönrock et al., 2024). Ziel der genetischen Modifikationen war die Akkumulation des aus L-Arabinose gebildeten Zwischenprodukts D-Xylitol. Ohne die genetischen Deletionen in *A. niger* würde D-Xylitol in D-Xylulose, anschließend weiter in D-Xylulose-5-phosphat und dies dann in den Pentosephosphatweg eingeleitet werden. In diesem Kapitel wurde der Dreifach-Deletionsstamm mit Deletionen der Gene Xylitol-Dehydrogenase (XdhA), Sorbitol-Dehydrogenase (SdhA), D-Xylulose-Kinase (XkiA) mit einem Stamm verglichen, der zusätzlich einen konstitutiv geöffneten Fps1-Transporter (Fps1_{open}) zur Steigerung des D-Xylitol Exports aus *A. niger* enthielt (Rüllke, Schönrock et al., 2024). Der Fps1-Transporter gehört zur Familie der intrinsischen Membranproteine und wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* beschrieben. Der Transporter vermittelt den bidirektionalen, passiven Transport von Glycerin und spielt eine zentrale Rolle in der osmotischen Stressantwort. (Luyten et al., 1995; Rüllke, Schönrock et al., 2024)

² Teile dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht in: Knesebeck, Melanie; Rüllke, Marcel; Schönrock, Veronika; Benz, J. Philipp; Weuster-Botz, Dirk (2024): D-Xylitol production from sugar beet press pulp hydrolysate with engineered *Aspergillus niger*. In: *Microorganisms* **12** (2489). DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122489>.

Die Charakterisierung der Stämme erfolgte in einem kontrollierten Rührkesselreaktor unter Verwendung eines standardisierten Satzverfahrens (Kapitel 4.3.6) mit synthetischem Medium mit $6,5 \text{ g L}^{-1}$ D-Glukose als Kohlenstoffquelle und 10 g L^{-1} L-Arabinose als Edukt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten traten bei der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentrationen zu große Schwankungen auf, weshalb diese nicht dargestellt sind.

Die Veränderung der Gelöstsauerstoffkonzentration und die Begasungsrate im Prozessverlauf sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Die pO_2 -Sonden des Dreifach-Deletionstamms zeigte ein verrauschtes Signal. Nach etwa 40 h trat bei beiden Stämmen eine Sauerstofflimitierung auf. Beim *A. niger*-Stamm ohne Fps1-Transporter wurde eine totale Sauerstofflimitierung bis etwa 46 h beobachtet.

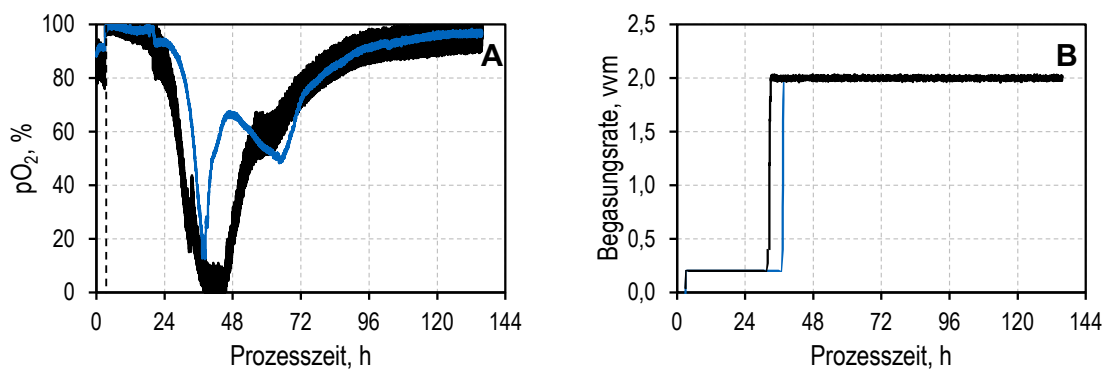


Abbildung 6.1: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ (schwarz) und *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ $\text{Ptv}dA\text{-FPS1}_{\text{open}}$ (blau) in synthetischem Medium im Rührkesselreaktor: (A) Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium und (B) die Begasungsrate während der Kultivierung. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min^{-1} reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden (gestrichelte Linie). ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft, initial}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Die Zuckerkonzentrationen im Fermentationsverlauf sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Bei beiden Stämmen wurde D-Glukose innerhalb von 39 h vollständig verwertet. Der Verbrauch von L-Arabinose begann erst nach der vollständigen Metabolisierung von D-Glukose. Beim *A. niger*-Stamm ohne Transporter wurde L-Arabinose innerhalb von 48 h verbraucht, während der Verbrauch beim Fps1-Transporterstamm nach 64 h abgeschlossen war. Die D-Xylitolbildung war beim *A. niger*-Stamm ohne Fps1-Transporter mit maximal $0,2 \text{ g L}^{-1}$ nach 43 h Kultivierung sehr gering. Die maximale D-Xylitolkonzentration des Fps1-Transporterstamms lag bei $2,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 63 h. Nach dem vollständigen Verbrauch von L-Arabinose wurde das gebildete D-Xylitol wieder verstoffwechselt.

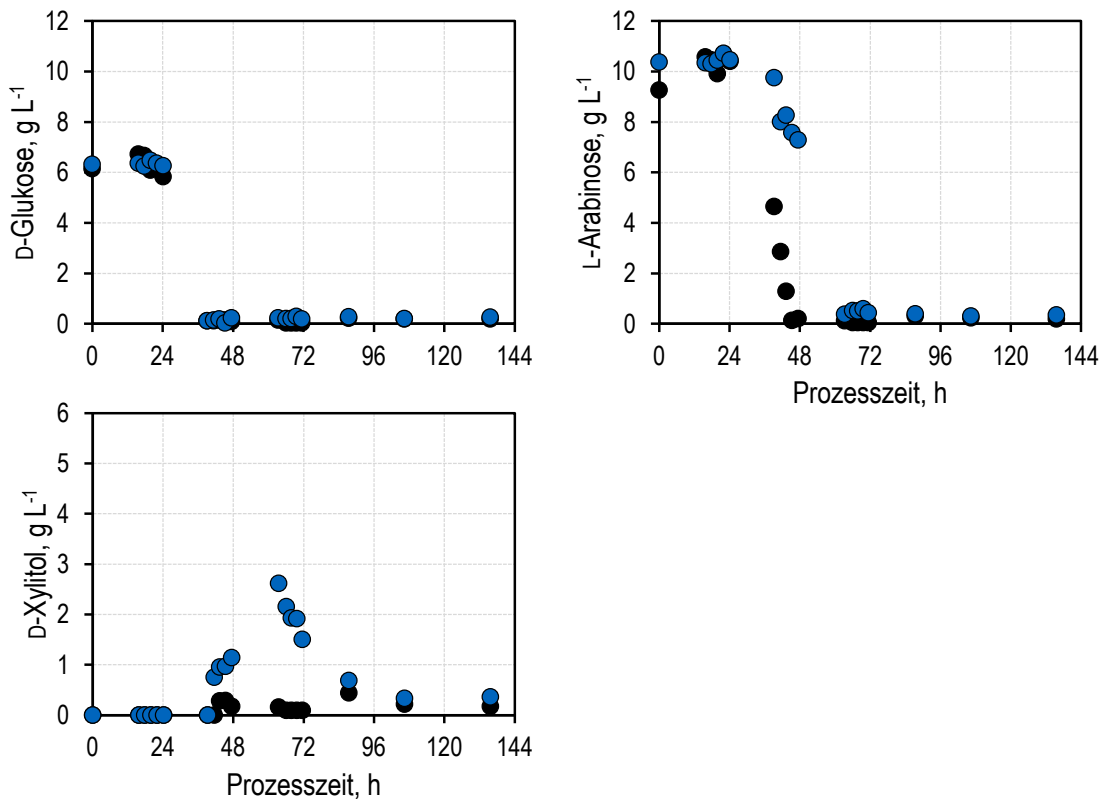


Abbildung 6.2: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ (schwarz) und *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ PtdA-FPS1_{open} (blau) in synthetischem Medium im Rührkesselreaktor: Zuckerkonzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose und D-Xylitol im Medium. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min⁻¹ reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 600 min⁻¹, F_{Luft, initial} = 0,2 vvm, V_R = 0,7 L, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Diskussion

Die Kombination der dreifachen Gendeletion ($\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$) mit dem Fps1-Transporter in *A. niger* NRRL3 führte zur D-Xylitolproduktion. Ohne die Expression des Fps1-Transporters wurde nur eine sehr geringe D-Xylitolkonzentration gemessen.

Allerdings wurde das gebildete D-Xylitol nach dem vollständigen Verbrauch von L-Arabinose erneut verstoffwechselt. Zudem konnte zu dem Zeitpunkt der Probenahme nicht der maximale D-Xylitolgehalt beim Fps1-Transporterstamm erfasst werden. Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Untersuchung einer prozesstechnischen Strategie zur Verhinderung der D-Xylitol-Metabolisierung. Eine vollständige genetische Deletion aller an der D-Xylitol-Verstoffwechselung beteiligten Enzyme ist nicht praktikabel. Denn das vermutlich involvierte Enzym L-Arabitol-Dehydrogenase (LadA) katalysiert die Umsetzung von L-Arabitol zu L-Xylulose. Dies ist der zweite Schritt des L-Arabinose-Stoffwechselweges von *A. niger* und somit ist das Enzym essenziell für die D-Xylitolproduktion (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022).

6.2. Vermeidung der D-Xylitol-Metabolisierung im Satzverfahren

Um im Satzverfahren eine maximale D-Xylitolkonzentration zu erreichen, muss verhindert werden, dass D-Xylitol nach der Synthese wieder von *A. niger* verstoffwechselt wird. Zur Inaktivierung des Stoffwechsels von *A. niger* nach der vollständigen L-Arabinose Umsetzung wurde die Begasung mit Zuluft gestoppt. Dieser Zeitpunkt wurde im vorherigen Kapitel nach 60 h für den *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}*-Stamm erreicht (siehe Kapitel 6.1).

Die Kultivierung erfolgte in einem kontrollierten Rührkesselreaktor unter Verwendung eines standardisierten Satzverfahrens (Kapitel 4.3.6) mit synthetischem Medium mit 7,5 g L⁻¹ D-Glukose als Kohlenstoffquelle und 11 g L⁻¹ L-Arabinose als Edukt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten traten bei der Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentrationen zu große Schwankungen auf, weshalb diese nicht dargestellt sind.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration und die Begasungsrate sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die Begasungsrate wurde nach 36 h automatisiert erhöht und es trat keine Sauerstofflimitierung auf. Aufgrund einer Fehlregulation stieg die Begasungsrate nach 36 h, 48 h und 60 h kurzfristig auf Werte über 2 vvm. Nach dem Stopp der Begasung nach 60 h sank die Gelöstsauerstoffkonzentrationen auf 0 %.

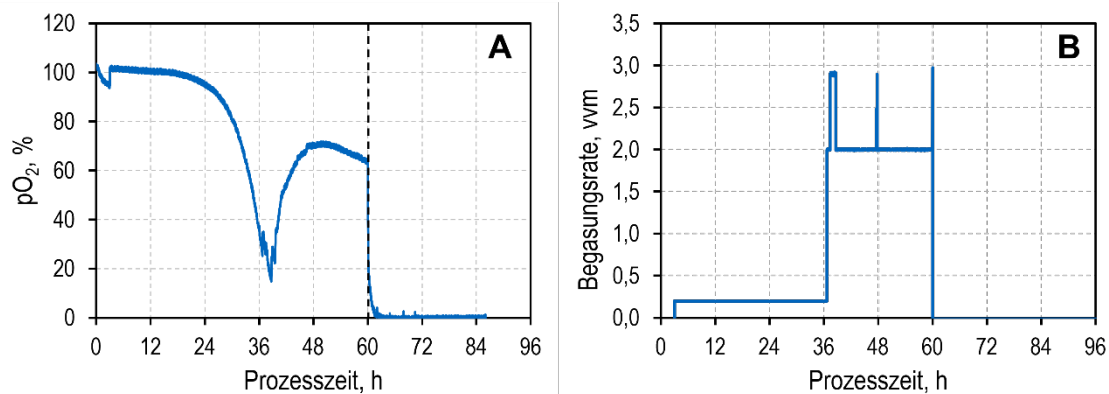


Abbildung 6.3: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* in synthetischem Medium im Rührkesselreaktor: (A) Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium und (B) die Begasungsrate während der Kultivierung. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min⁻¹ reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Aufgrund einer Fehlregulation stieg die Begasungsrate nach 36 h, 48 h und 60 h kurzfristig auf Werte über 2 vvm. Die gestrichelte Linie markiert den Begasungsstopp nach 60 h basierend auf dem Zeitpunkt der vollständigen L-Arabinose Umsetzung im vorherigen Kapitel 6.1. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 600 min⁻¹, F_{Luft, initial} = 0,2 vvm, V_R = 0,7 L, 10⁹ Sporen L⁻¹).

Die Zuckerkonzentrationen sind in Abbildung 6.4 dargestellt. D-Glukose war innerhalb von 40 h verbraucht. Die L-Arabinose Umsetzung begann erst nach dem vollständigen Verbrauch von D-Glukose.

Der manuelle Begasungsstopp wurde jedoch zu früh durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Abschaltens der Begasung waren noch $3,4 \text{ g L}^{-1}$ L-Arabinose vorhanden. Die D-Xylitolkonzentration zu dem Zeitpunkt betrug $2,4 \text{ g L}^{-1}$ und die entsprechende D-Xylitolausbeute 30 %. Trotz des Abschaltens der Begasung wurde L-Arabinose noch bis zum Prozessende umgesetzt und auch die D-Xylitolkonzentration verringerte sich. Die finale D-Xylitolkonzentration betrug $2,1 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Ausbeute von 22,6 %.

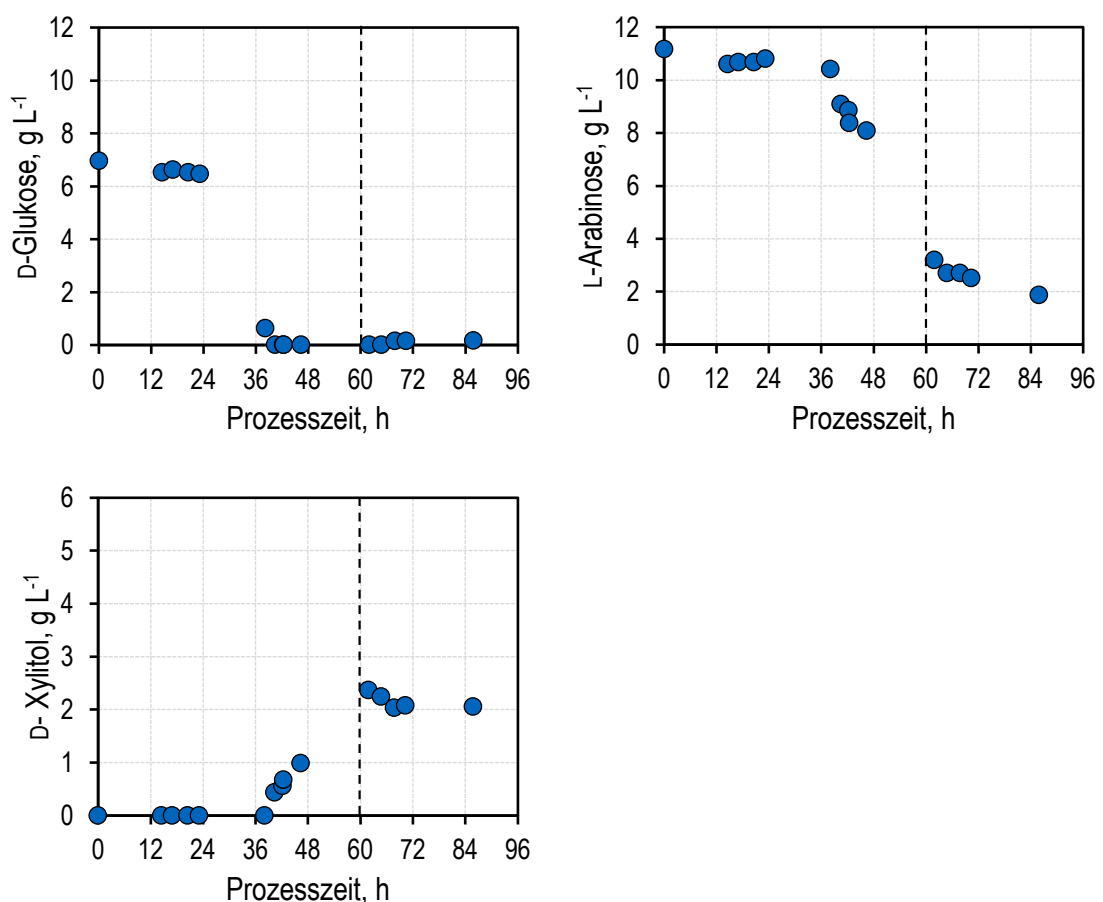


Abbildung 6.4: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA}-FPS1_{open}* in synthetischem Medium im Rührkesselreaktor: Zuckerkonzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose und D-Xylitol im Medium. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min^{-1} reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Die gestrichelte Linie markiert den Begasungsstopp nach 60 h basierend auf dem Zeitpunkt der vollständigen L-Arabinose Umsetzung im vorherigen Kapitel 6.1. ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft, initial}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Die manuelle Abschaltung der Begasung ist problematisch, da während des Satzprozesses keine Messdaten der L-Arabinosekonzentration verfügbar sind. Daher wurde im Anschluss die metabolische Aktivität untersucht, um einen Zusammenhang

zum Substratverbrauch identifizieren zu können. Da *A. niger* zur Biofilmbildung auf der pO₂-Sonde neigt, ist die Gelöstsauerstoffkonzentration als Indikator für den Substratverbrauch ungeeignet. Die CO₂- und O₂-Konzentrationen im Abgas korrelieren mit der metabolischen Aktivität von *A. niger* und werden im Gegensatz zur Gelöstsauerstoffkonzentration nicht durch physikalische Effekte im Rührkesselreaktor beeinflusst. Die Konzentrationen im Abgas könnten daher als Indikator für den Substratverbrauch dienen. Hierzu war eine konstante Begasungsrate erforderlich, um die durch die Begasungsrate bedingte CO₂- und O₂-Konzentrationsänderungen in Abgas zu vermeiden.

Die einfach reproduzierten Satzprozesse wurden mit unterschiedlicher Prozessdauer in einem kontrollierten Rührkesselreaktor unter Verwendung eines standardisierten Satzverfahrens (Kapitel 4.3.6) im 3 L-Maßstab durchgeführt. Dabei wurde synthetisches Medium mit 7,5 g L⁻¹ D-Glukose als Kohlenstoffquelle und 10 g L⁻¹ L-Arabinose als Edukt eingesetzt. Die Inokulation erfolgte mit 30 mL einer Schüttelkolbenvorkultur (siehe Kapitel 4.3.3). Aufgrund technischer Schwierigkeiten traten bei der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentrationen zu große Schwankungen auf, weshalb diese nicht dargestellt sind.

Die CO₂- und O₂-Konzentrationen im Abgas sind in Abbildung 6.5 dargestellt. Die maximale metabolische Aktivität wurde nach etwa 50 h erreicht, mit CO₂-Konzentrationen von 1,1 % (schwarz) und 0,8 % (grau). Nach einem plötzlichen Abfall der CO₂-Konzentration sank diese kontinuierlich bis zum nächsten Abfall nach etwa 82 h (schwarz) beziehungsweise 95 h (grau) auf 0,2 %.

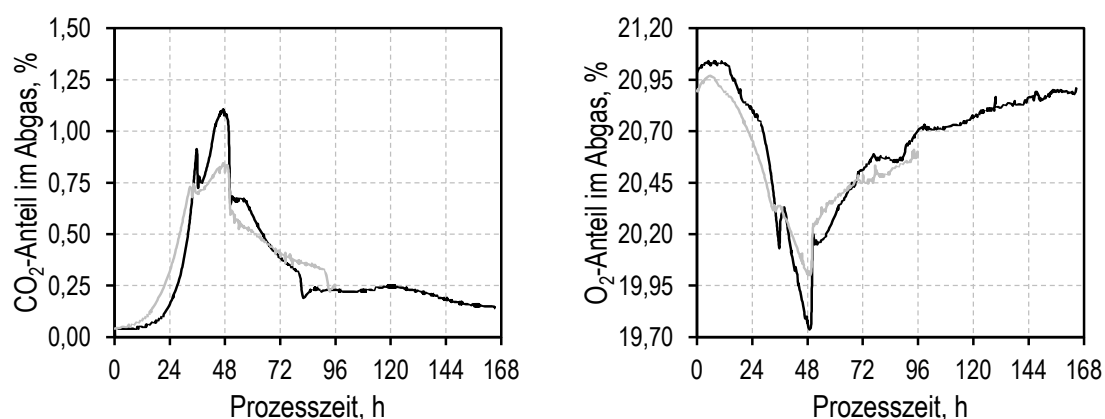


Abbildung 6.5: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* mit synthetischem Medium (einfach reproduziert): CO₂- und O₂-Konzentration im Abgas. Die Inokulation erfolgte mit 30 mL einer Schüttelkolbenvorkultur (Inkubation für 96 h bei 30 °C und 180 min⁻¹) des *A. niger*-Stammes. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 600 min⁻¹, F_{Luft} = 0,2 vvm, V_R = 3 L).

Die Zuckerkonzentrationen sind in Abbildung 6.6 dargestellt. In beiden Experimenten war D-Glukose innerhalb von 48 h verbraucht. Die L-Arabinose Metabolisierung begann bereits vor dem vollständigen Verbrauch der D-Glukose nach 30 h. L-Arabinose war nach etwa 93 h verbraucht (grau). Die maximal gemessene D-Xylitolkonzentration betrug $2,9 - 3,0 \text{ g L}^{-1}$ nach etwa 70 h beziehungsweise 92 h. Aufgrund fehlender Messdaten im Bereich zwischen 70 – 90 h könnten höhere D-Xylitolkonzentrationen in den Satzprozessen erreicht worden sein. Anschließend wurde das gebildete D-Xylitol im längeren Satzprozess wieder vollständig verstoffwechselt.

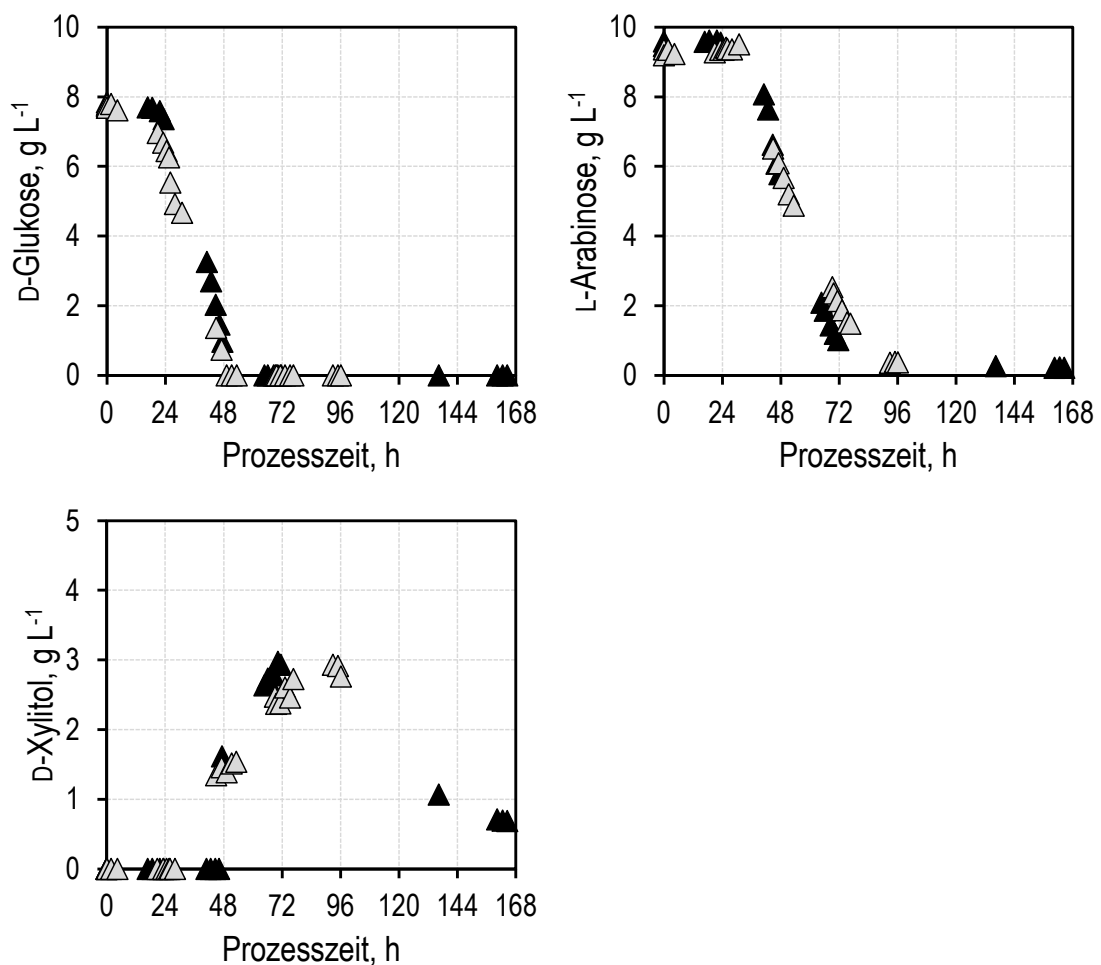


Abbildung 6.6: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tdA}-FPS1_{open}* mit synthetischem Medium (einfach reproduziert): Zuckerkonzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose und D-Xylitol im Medium. Die Inokulation erfolgte mit 30 mL einer Schüttelkolbenvorkultur (Inkubation für 96 h bei 30 °C und 180 min^{-1}) des *A. niger*-Stammes. ($T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 3 \text{ L}$).

Der direkte Vergleich von CO_2 -Konzentration im Abgas mit den Konzentrationen von D-Glukose und L-Arabinose ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Die erste rapide Abnahme der CO_2 -Konzentration im Abgas nach 50 h fiel zeitlich auf den vollständigen Verbrauch von D-Glukose zusammen. Ein weiterer starker Abfall der CO_2 -Konzentration wurde

jeweils nach 81 h und 92 h beobachtet. Zwischen 77 h und 93 h lagen jedoch keine Messdaten zu den Zuckerkonzentrationen vor.

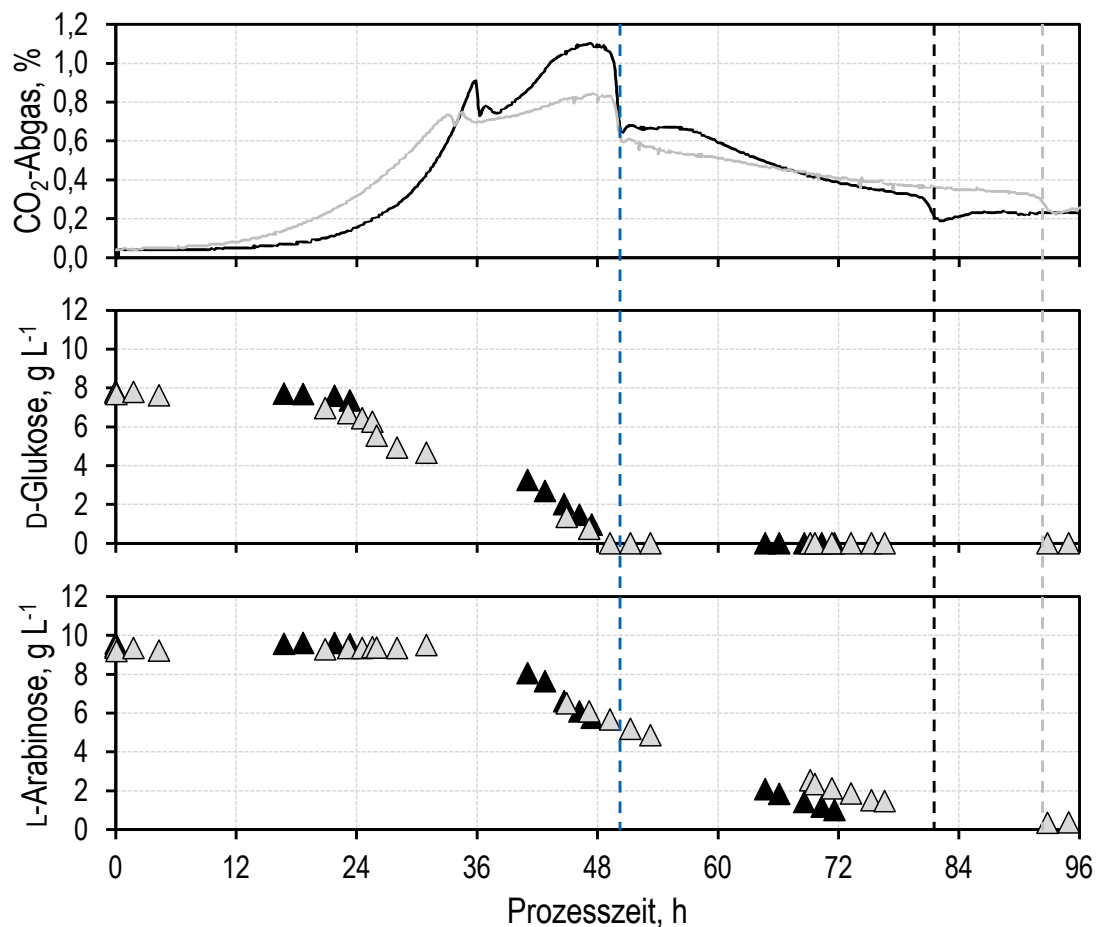


Abbildung 6.7: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA-FPS1}_{open}* in synthetischem Medium (einfach reproduziert): Vergleich der CO₂-Konzentration im Abgas mit den Zuckerkonzentrationen von D-Glukose und L-Arabinose im Medium. Die Inokulation erfolgte mit 30 mL einer Schüttelkolbenvorkultur (Inkubation für 96 h bei 30 °C und 180 min⁻¹) des *A. niger*-Stammes. Die gestrichelten Linien markieren den starken Abfall in der CO₂-Konzentration im Abgas. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 600 min⁻¹, F_{Luft} = 0,2 vvm, V_R = 3 L).

Die Abnahme der CO₂-Konzentration im Abgas könnte als Schwellenwert für einen automatischen Begasungsstopp eingesetzt werden. Hierzu wurden weitere Satzprozesse zweifach in synthetischem Medium durchgeführt, das 12 g L⁻¹ D-Glukose als Kohlenstoffquelle und 13 g L⁻¹ L-Arabinose als Edukt enthielt. Die Konzentrationen wurden hierbei an das Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat angepasst. Die Rührkesselreaktoren wurden mit 0,7 L Medium betrieben und mit 10⁹ Sporen L⁻¹ *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA-FPS1}_{open}* inokuliert. Die CO₂- und O₂-Konzentrationen im Abgas wurden bei konstanter Begasung und Rührerdrehzahl gemessen (siehe Abbildung 6.8). Das automatische Abschalten der Luftbegasung wurde durch Unterschreiten des Schwellenwert von 0,6 % in der CO₂-Konzentration im Abgas

ausgelöst. Dieser Schwellenwert wurde auf Grundlage der im Durchschnitt höheren maximalen CO_2 -Konzentrationen in diesem Satzprozess im Abgas festgelegt, wobei das Verhältnis der CO_2 -Konzentrationen einbezogen wurde (siehe Abbildung 6.7). Um einen vorzeitigen Stopp zu vermeiden wurde die Steuerung der Begasungsabschaltung erst nach 48 h aktiviert. Direkt im Anschluss an das Erreichen des Schwellenwertes erfolgte die Begasung mit Stickstoff für 2 min, um den verbliebenen Sauerstoff in den Bioreaktoren vollständig zu verdrängen. Die Inaktivierung von *A. niger* durch Anaerobisieren diente zur Verringerung des oxidativen Potentials der Zellen, um die Umwandlung von D-Xylitol zu D-Xylulose zu verhindern.

Die maximale metabolische Aktivität wurde nach 40 h oder 43 h erreicht (siehe Abbildung 6.8). Die maximalen CO_2 -Konzentrationen im Abgas waren 1,8 % oder 1,5 %. Die Begasung wurde nach 70 h oder 76 h automatisch gestoppt.

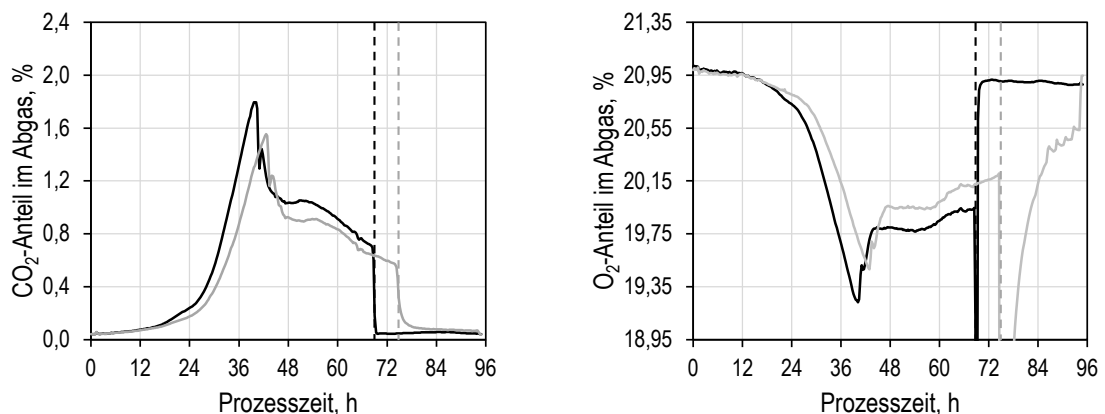


Abbildung 6.8: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA}-FPS1_{open}* in synthetischem Medium (einfach reproduziert): CO_2 - und O_2 -Konzentration im Abgas. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min^{-1} reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Die gestrichelten Linien zeigen den in Abhängigkeit der CO_2 -Konzentration automatisierten Begasungsstopp, nachdem der Schwellenwert von 0,6 % unterschritten wurde. ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Die Zucker- und Biotrockenmassekonzentrationen dieser beiden Satzprozesse sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Die Kohlenstoffquelle D-Glukose war innerhalb von 44 h in beiden Satzprozessen verbraucht. Die Verstoffwechselung von L-Arabinose erfolgte erst nachdem die D-Glukose vollständig verbraucht war und war anschließend nach 70 h oder 76 h fast vollständig aufgebraucht. Dies entspricht auch den Prozesszeiten des Absinkens der CO_2 -Konzentrationen im Abgas, was die Begasungsstopps auslöste (gestrichelte Linien in Abbildungen 6.8 und 6.9). In beiden Prozessen wurde jedoch die L-Arabinose nicht vollständig verbraucht und es blieben jeweils $0,7 \text{ g L}^{-1}$ übrig. Dementsprechend wurden von der initial eingesetzten L-Arabinose bis zum

automatischen Begasungsstopp etwa $12,3 \text{ g L}^{-1}$ verbraucht, was etwa 95 % der eingesetzten L-Arabinosekonzentration entspricht. Die Bildung von D-Xylitol begann etwa 4 h nach dem Beginn der L-Arabinose Umsetzung. Nach dem Begasungsstopp wurde eine weitere D-Xylitolbildung beobachtet, ohne weiteren Umsetzung der restlichen L-Arabinose. Die finalen D-Xylitolkonzentrationen waren $4,6 \text{ g L}^{-1}$. Es wurden damit finale D-Xylitolausbeuten von $0,36 \text{ g g}^{-1}$ oder $0,37 \text{ g D-Xylitol g}^{-1} \text{ L-Arabinose}$ erzielt. Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen von $22,9 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$ oder $23,5 \pm 1,7 \text{ g L}^{-1}$ wurden kurz nach dem Auftreten der maximalen Stoffwechselaktivitäten beider Satzprozesse gemessen. Es wurden Biomasseausbeuten von $0,58 \pm 0,07 \text{ g Biotrockenmasse g}^{-1} \text{ Glukose}$ oder $0,61 \pm 0,14 \text{ g Biotrockenmasse g}^{-1} \text{ Glukose}$ ermittelt. Anschließend wurde ein linearer Abfall der Biotrockenmassekonzentrationen beobachtet bis zu einer Reduktion auf $11,6 \pm 0,9 \text{ g L}^{-1}$ oder $13,2 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}$ am Ende der beiden Satzprozesse.

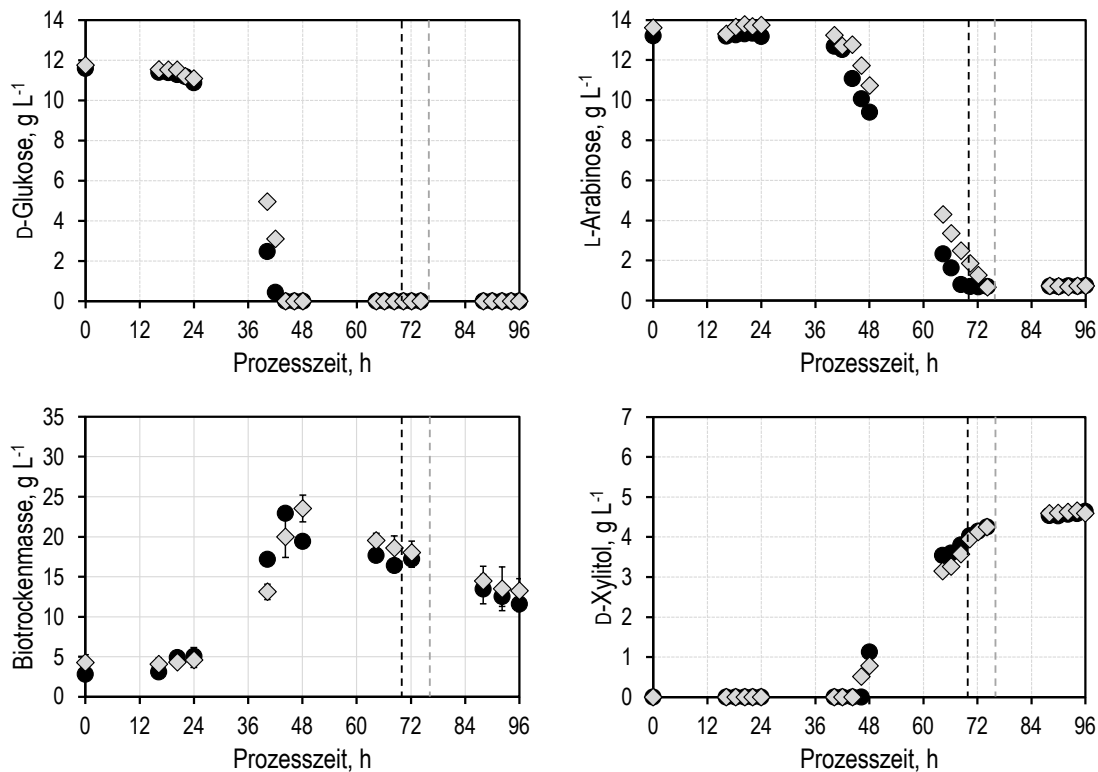


Abbildung 6.9: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1*_{open} in synthetischem Medium (einfach reproduziert): Konzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose, Biotrockenmasse und D-Xylitol. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min^{-1} reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Die gestrichelten Linien zeigen den in Abhängigkeit der CO_2 -Konzentration automatisierten Begasungsstopp, nachdem der Schwellenwert von 0,6 % unterschritten wurde. Zu den Zeitpunkten war L-Arabinose im Medium verbraucht und die Inaktivierung von *A. niger* diente der Verhinderung der Verstoffwechselung von D-Xylitol. ($T = 30^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Diskussion

Der weitere Verbrauch von L-Arabinose nach dem Begasungsstopp (siehe Abbildung 6.4) deutet darauf hin, dass der Metabolismus von *A. niger* durch die Sauerstofflimitation nicht vollständig inaktiviert wurde. Eine Alternative zur Abschaltung der Begasung mit Luft könnte die Stickstoffbegasung bis zur vollständigen Verdrängung von Sauerstoff sein. Das könnte zu einer effizienteren Inaktivierung von *A. niger* führen.

Die duplizierten Versuche im 3 L-Maßstab zeigten Unterschiede bei der metabolischen Aktivität (siehe Abbildung 6.5). Ein Grund könnte der Einsatz von vegetativen Vorkulturen anstatt der Inokulation mit Sporen sein. Hierbei gestaltet sich eine einheitliche Inokulationsmenge aufgrund der Morphologie von Pilzen schwierig. Bei filamentösen Pilzen kann die optische Dichte nicht mit der Biomassekonzentration korreliert werden.

Beim Vergleich der CO₂-Konzentration im Abgas zu den Konzentrationen von D-Glukose (siehe Abbildung 6.7) konnte ein Zusammenhang beim vollständigen Verbrauch festgestellt werden. Der Zusammenhang von CO₂-Konzentration zur vollständigen L-Arabinose Umsetzung war aufgrund fehlender Messdaten nicht möglich, jedoch könnten die starken Abnahmen der CO₂-Konzentration nach 81 h und 92 h darauf hinweisen.

Die fortlaufende D-Xylitolbildung trotz fast vollständig verbrauchter L-Arabinose könnte auf verzögertem Export von intrazellulärem D-Xylitol über den Fps1-Transporter zurückzuführen sein (siehe Abbildung 6.9). Kinetische Daten zum D-Xylitol Transport durch den Fps1-Transporter, der mittels Glycerintransports zur Regulierung der osmotischen Stresstoleranz in *S. cerevisiae* beiträgt (Rüllke, Schönrock et al., 2024), liegen bislang nicht vor.

Der lineare Abfall der Biotrockenmassekonzentrationen, nachdem die D-Glukose im Medium vollständig verbraucht ist, deutet auf eine konstante Lyse der *A. niger* Zellen hin (siehe Abbildung 6.9).

Es zeigte sich, dass die CO₂-Konzentration im Abgas mit einem Grenzwert von 0,6 % ein geeigneter Indikator für den automatisierten Begasungsstopp bei der Umsetzung von L-Arabinose zu D-Xylitol im synthetischen Medium ist (siehe Abbildung 6.8 und 6.9).

6.3. D-Xylitolproduktion mit Hydrolysat

6.3.1. Verwendbarkeit von Hydrolysat durch *A. niger*

Die Eignung von dem im integrierten Prozess produzierten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat (siehe Kapitel 5) als Substrat für das Wachstum von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* wurde untersucht. In einem ersten Versuch mit Hydrolysat-Medium in Schüttelkolben zeigte sich, dass kein Wachstum erfolgte. Daher wurden gezielt Untersuchungen zur Wachstumsinhibierung von *A. niger* durch das Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat durchgeführt.

Im ersten Teil der Inhibierungsstudie wurden während der Hydrolyse im integrierten Prozess (siehe Abbildung 6.10) nach 3 h, 27 h, 51 h, 75 h und 99 h jeweils 80 mL Hydrolysat entnommen, zentrifugiert und der Überstand für die Kultivierung des *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* in 250 mL Schüttelkolben verwendet. Diese wurden für sieben Tage inkubiert. Täglich erfolgten mikroskopische Untersuchungen sowie die Bestimmung der Zuckerkonzentrationen im Medium, um das Wachstum von *A. niger* zu analysieren.

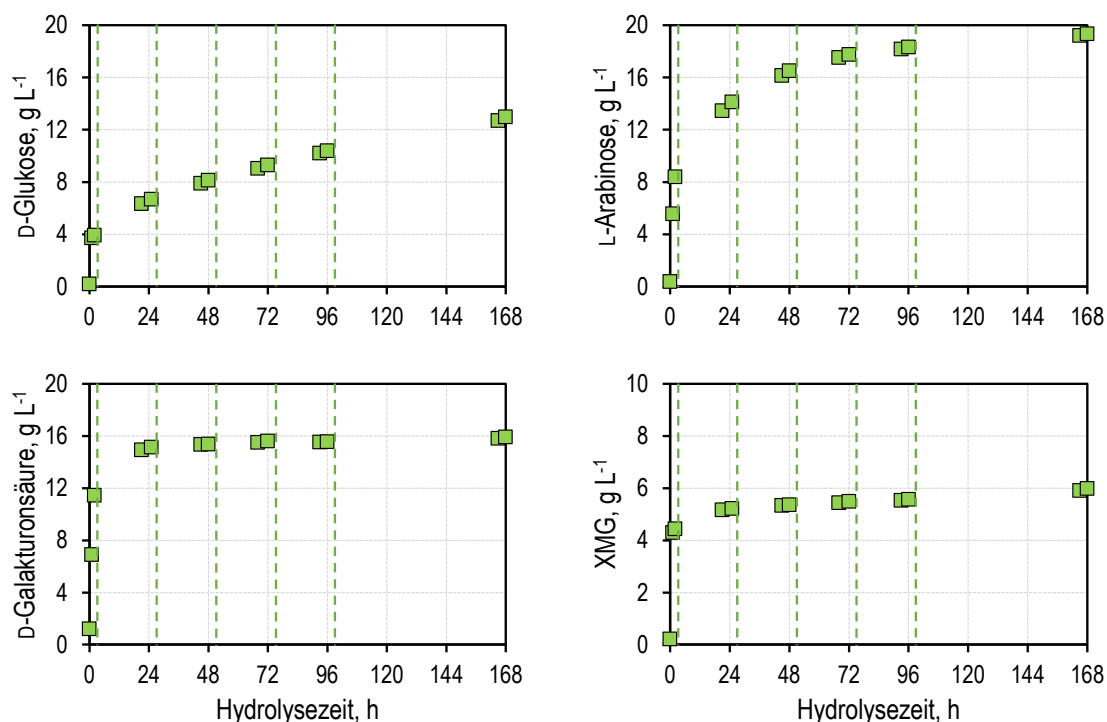


Abbildung 6.10: Untersuchung der Eignung von Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für die Umsetzung von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}*: Zuckerkonzentrationen während enzymatischer Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel im integrierten Verfahren. Konzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG). Die grün gestrichelten Linien kennzeichnen die Zeitpunkte der Hydrolysatentnahme zur nachfolgenden Untersuchung der Substrateignung. (T = 50 °C, pH = 4,5, n = 220 min⁻¹).

Es zeigte sich, dass Wachstum von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* nur in dem Schüttelkolben mit der ersten Hydrolysatsprobe (3 h) möglich war. In allen anderen Ansätzen trat kein Wachstum auf (siehe Abbildung 10.2). In den Schüttelkolben mit Wachstum wurden D-Glukose und XMG vollständig verbraucht, während die D-Galakturonsäure- und L-Arabinosekonzentrationen reduziert wurden. In den Schüttelkolben ohne sichtbares Wachstum blieben die Zuckerkonzentrationen unverändert.

Nach Abschluss des integrierten Prozesses wurde das verbleibende Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat geerntet in Duplikaten für weitere Wachstumsstudien in Schüttelkolben verwendet. Hierbei wurde das Hydrolysat mit sterilem VE-Wasser in unterschiedlichen Verdünnungen (10 %, 25 %, 50 %, 100 %) angesetzt und mit synthetischem Medium mit 16 g L⁻¹ D-Glukose als Kohlenstoffquelle verglichen. Ziel war es, die Hydrolysat Konzentration zu bestimmen, bei der das Wachstum von *A. niger* inhibiert wird.

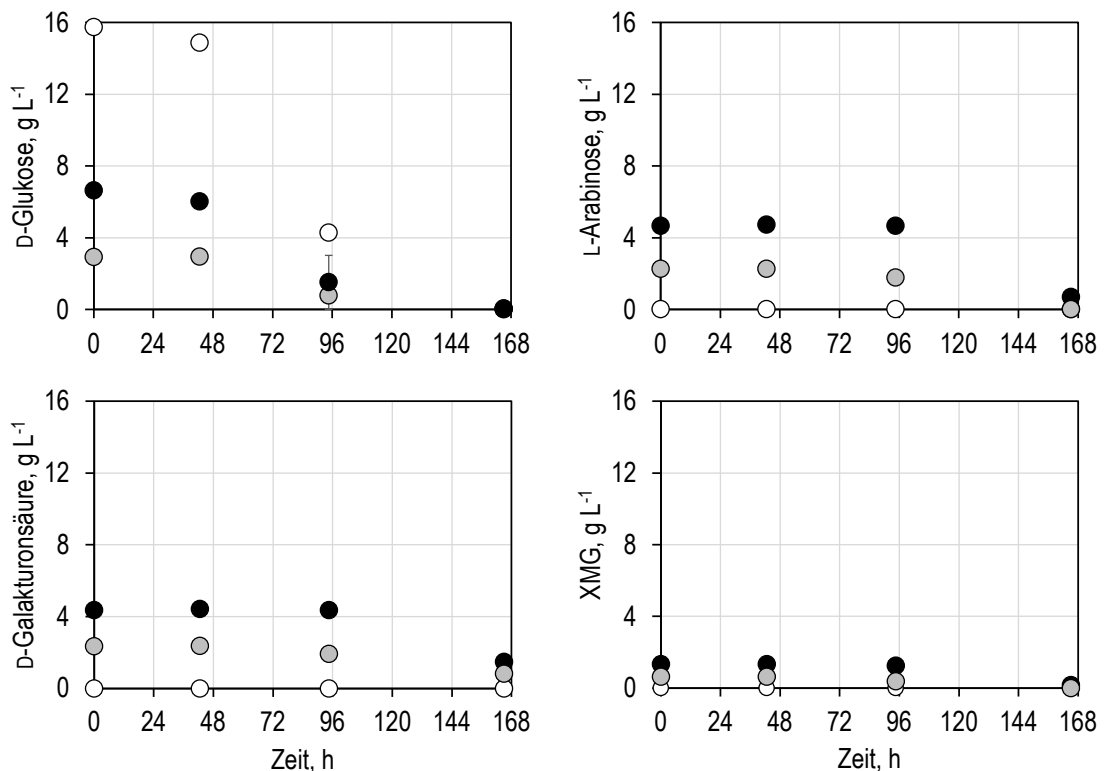


Abbildung 6.11: Untersuchung der Eignung von Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für die Umsetzung von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}*: Konzentrationen von D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose (XMG) während Kultivierung von *A. niger* in Schüttelkolben. Es wurden verschiedene Verdünnungen des Hydrolysats im Medium untersucht, jedoch trat nur bei 25 % (schwarz) und 10 % (grau) Hydrolysat sowie im synthetischen Medium (weiß) Wachstum von *A. niger* auf. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 180 min⁻¹).

Nach Inokulation mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}*-Sporen wurden die Schüttelkolben bei 30 °C und 180 min⁻¹ inkubiert.

Die Zuckerkonzentrationen sind in Abbildung 6.11 dargestellt. Bei einer Verdünnung von 10 % und 25 % sowie in synthetischem Medium trat Wachstum auf, wobei *A. niger* Pellets ausbildete (siehe Abbildung 10.3) und die Zucker innerhalb von 168 h verbrauchte. Bei höheren Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat-Anteilen von 50 % und 100 % war kein Wachstum sichtbar, und der Zuckerverbrauch blieb aus.

Um die inhibitorischen Substanzen im Hydrolysat zu entfernen, wurde eine Aktivkohle-Behandlung durchgeführt. Dabei wurde 100 mL Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für 5 min mit 8,8 g dampfaktivierte Aktivkohle versetzt (siehe Abbildung 10.4). Nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 14.000 x g und Sterilfiltration (0,22 µm, Minisart®, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde das geklärte Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat für eine weitere Kultivierung von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* in Schüttelkolben verwendet. In dem behandelten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat trat Wachstum auf.

Diskussion

Das erste Schüttelkolbenexperiment zeigte, dass wachstumshemmende Komponenten zwischen 3 h und 27 h enzymatischer Hydrolyse im integrierten Verfahren freigesetzt wurden. Im darauffolgenden Experiment konnte erst bei einer Verdünnung des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats auf 25 % Wachstum von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* beobachtet werden.

Die Freisetzung wachstumshemmender Nebenprodukte aus der enzymatischen Lignin-Umsetzung kann während der Hydrolyse auftreten (Fernandes et al., 2023; Kühnel et al., 2011; Rafiqul et al., 2014). Der Ligningehalt von Zuckerrübenpressschnitzel wird mit 4,4 – 5,5 % angegeben (Aarabi et al., 2017; Li et al., 2018). Weiteren Studien zeigen, dass durch Säurehydrolyse hemmenden Nebenprodukte aus Zuckerrübenpressschnitzel freigesetzt werden, darunter Furanderivate (z. B. Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural), phenolische Verbindungen und schwache organische Säuren. In einer Studie enthielt das Hydrolysat nach Säurehydrolyse 45,3 g L⁻¹ an reduzierenden Zuckern, 51,5 g L⁻¹ an Furanderivaten, 2,9 g L⁻¹ an phenolischen Verbindungen und 3,8 g L⁻¹ Essigsäure (Günan Yücel & Aksu, 2015). Das Wachstum von *A. niger* wird um 50 % gehemmt, wenn 1,68 g L⁻¹ (beziehungsweise 17,12 mM) Furfural und 0,19 g L⁻¹ (beziehungsweise 1,51 mM) Hydroxymethylfurfural im Hydrolysat vorliegen (Martins et al., 2020).

Die dominierenden phenolische Verbindungen in Zuckerrübenpressschnitzel sind Epicatechin, Gallussäure und Quercetin-3-O-Rutinosid. Phenolische Verbindungen mit antifungaler Wirkung im Zuckerrübenhydrolysat umfassen Ferulasäure und Hydroxyzimtsäure-analoge Phenole (Arjeh et al., 2022). Eine andere Studie ermittelte die antifungale Wirkung verschiedener phenolischer Verbindungen. Gallussäure zeigte eine hemmende Wirkung bei Konzentrationen oberhalb von 1 g L^{-1} , während Ferulasäure das Wachstum von *Aspergillus flavus* bei einer Konzentration von $0,895 \text{ g L}^{-1}$ um 50 % reduzierte (Zabka & Pavela, 2013).

Die enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel wurde bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im integrierten Verfahren durchgeführt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Ascomyceten-Pilze, einschließlich *Aspergilli*, in der Lage sind, Lignin teilweise abzubauen, was zur Freisetzung potenziell hemmender, ligninabgeleiteter Verbindungen während der Hydrolyse bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ beitragen könnte. Im ersten Schritt des mikrobiellen Ligninabbaus werden extrazelluläre Oxidasen wie Laccasen und Peroxidasen durch holzabbauende Pilze sekretiert. (Brink et al., 2019; Ferrari et al., 2021).

Die Entfernung inhibitorischer Komponenten mit Aktivkohlebehandlung war erfolgreich. Verschiedene Studien zeigen, dass die Entgiftung von Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat mit Aktivkohle nach thermochemischer Hydrolyse vor der Fermentation möglich ist (Fayet et al., 2018; Günan Yücel & Aksu, 2015). Eine Vorbehandlung mit 20 g L^{-1} Aktivkohle führte zur Entfernung von 98 % der Furanderivate, 71 % der phenolischen Verbindungen und 10 % der Essigsäure (Günan Yücel & Aksu, 2015). In einer anderen Studie wurden durch die Behandlung von Zuckerrübenmelasse mit 58 g L^{-1} Aktivkohle 98 % der Farbe entfernt, ohne dass Saccharose und Betain mitadsorbiert wurden (Bernal et al., 2016).

Im behandelten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat konnte Wachstum von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1*_{open} beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die angewandte Vorbehandlung geeignet ist.

6.3.2. Umsetzung von vorbehandeltem Hydrolysat mit *A. niger*

Die Umsetzung von vorbehandeltem Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1*_{open} wurde zweifach im Satzprozess durchgeführt. Das Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat wurde in einem integrierten Verfahren hergestellt (siehe Kapitel 5). Zur Aktivkohlevorbehandlung wurden 88 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat zur Entfernung der wachstumsinhibierenden Inhaltsstoffe eingesetzt und dadurch wurde das Hydrolysat zudem auch

farblich geklärt (siehe Abbildung 10.4). Die Zuckerausbeute nach der Aktivkohlebehandlung betrugen 95,5 % D-Glukose, 95,7 % L-Arabinose, 92,8 % D-Galakturonsäure und 98,2 % D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose. Nach der Zugabe der für das Wachstum notwendige Zusätze zum geklärten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat betrugen die initialen Zuckerkonzentrationen im Medium 11 g L^{-1} D-Glukose, 13 g L^{-1} L-Arabinose, 12 g L^{-1} D-Galakturonsäure und 5 g L^{-1} D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose. Die Rührkesselreaktoren wurden mit 0,7 L Medium betrieben und jeweils mit 10^9 Sporen L^{-1} *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtvdA-FPS1_{open}* inokuliert. Als Grenzwert für den automatischen Begasungsstopp wurde 0,9 % gewählt. Dieser Wert wurde aufgrund der Annahme ausgewählt, dass der *A. niger*-Stamm aufgrund des parallelen Verbrauchs von D-Galakturonsäure im Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat mehr CO_2 produzieren werde.

Während der beiden Satzprozesse zeigten sich makromorphologische Unterschiede in Form unterschiedlich großer Pellets (siehe Abbildung 10.5).

Die CO_2 - und O_2 -Konzentrationen im Abgas wurden bei konstanter Begasung und Rührerdrehzahl gemessen (siehe Abbildung 6.12). Aufgrund einer undichten Spritze bei der Inokulation eines der beiden Rührkesselreaktors wurde eine geringere Menge Sporen inokuliert (rot in Abbildung 6.12). Die maximalen metabolischen Aktivitäten wurden nach 60 h oder 64 h erreicht. Die Begasung mit steriler Luft stoppte automatisch nach dem Abfallen der CO_2 -Konzentrationen im Abgas unter den Grenzwert von 0,9 % (gestrichelte Linien).

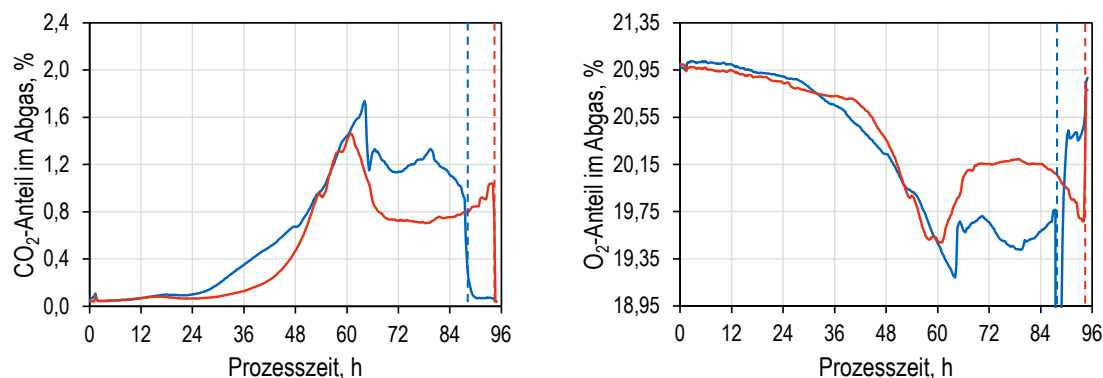


Abbildung 6.12: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtvdA-FPS1_{open}* mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium (einfach reproduziert): CO_2 - und O_2 -Konzentration im Abgas. Aufgrund einer undichten Spritze bei der Inokulation eines der beiden Rührkesselreaktors wurde eine geringere Menge Sporen inokuliert. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min^{-1} reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Die gestrichelten Linien zeigen den in Abhängigkeit der CO_2 -Konzentration automatisierten Begasungsstopp, nachdem der Schwellenwert von 0,9 % unterschritten wurde. ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, $n = 600 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 0,2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $10^9 \text{ Sporen L}^{-1}$).

Die Zucker- und Biotrockenmassekonzentrationen der Satzprozesse mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

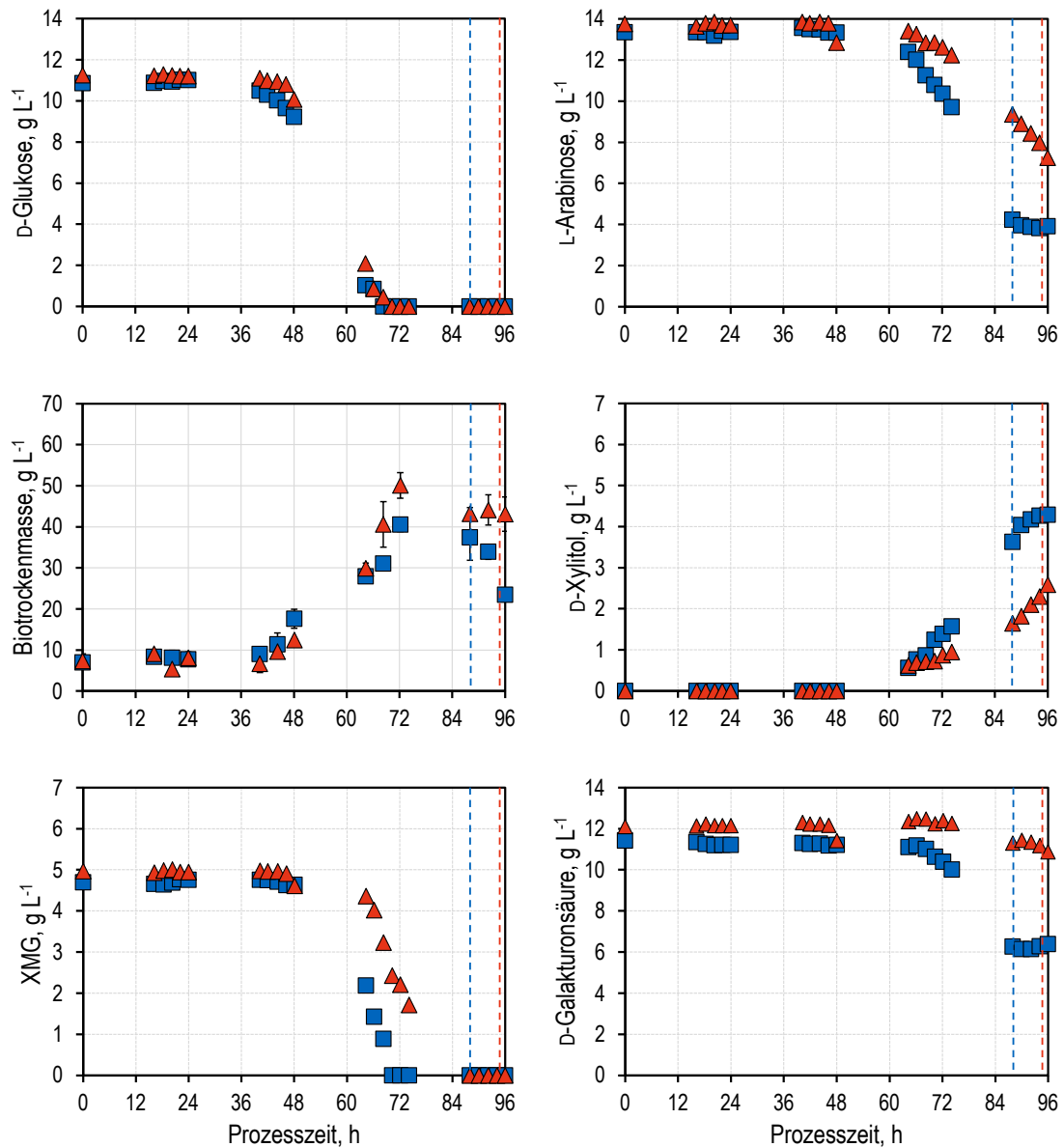


Abbildung 6.13: Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1_{open}* mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium (einfach reproduziert): D-Glukose, L-Arabinose, Biotrockenmasse und D-Xylitol, XMG (Xylose, Mannose, Galaktose) und D-Galakturonsäure-Konzentrationen im Medium. Aufgrund einer undichten Spritze bei der Inokulation eines der beiden Rührkesselreaktors (rot) wurde eine geringere Menge Sporen inokuliert. Die Begasung startete erst nach 3 h und währenddessen war die initiale Rührerdrehzahl auf 250 min⁻¹ reduziert, um Sporenaustrag zu vermeiden. Die gestrichelten Linien zeigen den in Abhängigkeit der CO₂-Konzentration automatisierten Begasungsstopp, nachdem der Schwellenwert von 0,9 % unterschritten wurde. (T = 30 °C, pH = 4,5, n = 600 min⁻¹, F_{Luft} = 0,2 vvm, V_R = 0,7 L, 10⁹ Sporen L⁻¹).

D-Glukose war innerhalb von 68 h oder 70 h umgesetzt und korrelieren mit dem Zeitpunkt des ersten starken Abfalls der CO₂-Konzentration im Abgas. Nach dem vollständigen Verbrauch von D-Glukose begann die Umsetzung von L-Arabinose und die Bildung von

D-Xylitol startete ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Nach 87 h (blau) oder 95 h (rot) und der Abnahme der CO₂-Konzentration im Abgas unter dem Schwellenwert wurde der automatische Begasungsstopp induziert. Zu dem Zeitpunkt war L-Arabinose noch nicht vollständig umgesetzt. Nach dem Stopp der Begasung blieben die L-Arabinose und D-Xylitolkonzentrationen konstant. Die finalen D-Xylitolkonzentrationen nach 96 h betrugen 4,3 g L⁻¹ oder 2,6 g L⁻¹. Die finalen D-Xylitolausbeuten betrugen 0,45 g g⁻¹ oder 0,4 g D-Xylitol g⁻¹ L-Arabinose. Die Zucker D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose wurden parallel zur D-Glukose verstoffwechselt und waren nach 68 h oder 87 h vollständig verbraucht. D-Galakturonsäure wird erst dann verstoffwechselt, sobald alle anderen Zucker außer L-Arabinose vollständig verbraucht sind. Aufgrund des Begasungsstopps wurden jeweils nur 4,9 g L⁻¹ oder 1,4 g L⁻¹ D-Galakturonsäure verbraucht.

Tabelle 6.1: Vergleich der wichtigsten Prozessleistungsindikatoren der Satzprozesse zur D-Xylitolproduktion mit synthetischem und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium mit *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$, *PtdA-FPS1_{open}*. Die Werte für synthetisches Medium sind die Mittelwerte aus beiden Prozessen und bei Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat sind die Prozesswerte mit Sporenverlust bei Inokulation in Klammern angegeben. Es werden die CO₂-Anteile im Abgas, die Biotrockenmasse (BTM)-Konzentrationen und die finalen D-Xylitolkonzentrationen und -ausbeuten verglichen.

Parameter	Synthetisches Medium	Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium
Maximale CO ₂ -Anteile, %	1,67 ± 0,13	1,71 (1,46)
Zeitpunkt des maximalen CO ₂ -Anteils, h	42 ± 1	64 (61)
Maximale BTM-Konzentration, g L ⁻¹	23,2 ± 0,3	40,5 ± 1,6 (50,1 ± 3,1)
Zeitpunkt der maximalen BTM-Konzentration, h	46 ± 2	72 (72)
Finale D-Xylitolkonzentration, g L ⁻¹	4,62 ± 0,02	4,3 (2,6)
Finale D-Xylitolausbeute, g g ⁻¹	0,36 ± 0,01	0,45 (0,4)

Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen von 40,5 ± 1,6 g L⁻¹ oder 50,1 ± 1,7 g L⁻¹ im Prozess mit Sporenverlust wurden kurz nach dem Auftreten der maximalen Stoffwechselaktivitäten beider Satzprozesse gemessen. Nach dem Begasungsstopp nahm die Biotrockenmassekonzentration im Satzprozess ohne Sporenverlust wieder ab

(siehe Abbildung 6.13 blau). Im Vergleich zu den Prozessen mit synthetischem Medium ist die Biotrockenmassebildung um etwa $17,3 \text{ g L}^{-1}$ erhöht.

Die wichtigsten Prozessleistungsindikatoren der Satzprozesse von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA-FPS1_{open}}* mit synthetischem und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium werden in Tabelle 6.1 verglichen. Die maximalen CO_2 -Anteile im Abgas waren mit synthetischem Medium höher und traten früher auf. Die Biotrockenmassekonzentration war mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium über 20 g L^{-1} höher. Die D-Xylitolausbeuten waren im Mittel um $0,06 \text{ g g}^{-1}$ höher mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat bei geringeren finalen D-Xylitolkonzentrationen.

Diskussion

Beim Vergleich der Satzprozesse mit unterschiedlichen Medien zeigt sich, dass die maximale CO_2 -Konzentration im Abgas mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat um 24 h zeitversetzt zu denen mit synthetischem Medium auftritt. Jedoch ist der absolute Wert des maximalen CO_2 -Anteils vergleichbar. Die beiden Prozesse mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat zeigen einen unterschiedlichen Verlauf der CO_2 -Anteile im Abgas, dies lässt sich auf den Verlust von Sporen bei einem der Satzprozesse zurückführen. Ein Unterschied zeigte sich auch in der Makromorphologie mit der Ausbildung unterschiedlich großer Pellets im Vergleich der beiden Satzprozesse (siehe Abbildung 10.5 im Anhang). Die Sporendichte bei der Inokulation beeinflusst die Morphologie von Pilzen (Müller et al., 2022).

Beim Vergleich der Biotrockenmassebildung mit synthetischem und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium war diese bei Letzteren deutlich erhöht. Im Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat sind neben D-Glukose noch weitere Zucker wie D-Xylose, D-Mannose, und D-Galaktose vorhanden. Diese Zucker werden parallel verbraucht, was zu einer erhöhten Biomasseproduktion führt. Zudem enthält Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat neben fermentierbaren Zucker weitere Nährstoffe, die ein mikrobielles Wachstum unterstützen können (Dygas et al., 2023; Martins et al., 2021). Die erhöhte Biotrockenmassekonzentration führte jedoch nicht zu einer erhöhten L-Arabinose Umsetzung, obwohl somit mehr Ganzzellbiokatalysator für die Umsetzung zur Verfügung steht. In einer Studie von Rüllke, Schönrock et al. (2024) wurden durch den Einsatz verschiedener Promotoren unterschiedliche *FPS1_{open}*-Expressionsraten zur D-Xylitolproduktion untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine höhere Expressionsrate zu einer gesteigerten D-Xylitolausbeute führte. Dies legt nahe, dass der Transportmechanismus eine zentrale Rolle in der D-Xylitolproduktion und -ausbeute spielt. Eine Akkumulation von D-Xylitol in den Zellen führt zu einer

reduzierten Umwandlung von L-Arabinose zu D-Xylitol, da D-Xylitol aufgrund der reversiblen Reaktion zurück zu L-Xylulose umgesetzt werden könnte (Meng et al., 2022; Rüllke, Schönrock et al., 2024). Es ist daher anzunehmen, dass die D-Xylitolkonzentration im Medium durch die Exportrate des Fps1-Transporters limitiert wird.

Beim Vergleich der D-Xylitolausbeuten zeigte sich die höchste Ausbeute mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium (45 % im Vergleich zu 36 %), auch wenn die finale D-Xylitolkonzentration im Vergleich niedriger ist. Die erhöhte Ausbeute mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat ist wahrscheinlich auf die zusätzlichen Kohlenstoffquellen im Medium zurückzuführen, da die Pilze diese parallel zur D-Xylitolbildung weiterhin umsetzen können. Darauf deutet auch die konstante Biotrockenmassekonzentration nach Verbrauch von D-Glukose, D-Xylose, D-Mannose, und D-Galaktose in den beiden Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Satzprozessen hin. Nach dem Begasungsstopp nimmt jedoch die Biotrockenmassekonzentration trotz der verbleibenden Zucker im Medium aufgrund der Sauerstofflimitierung ab. Die Gesamtausbeute an D-Xylitol aus den Zuckerrübenpressschnitzel nach Hydrolyse im integrierten Verfahren, Aktivkohle Behandlung und D-Xylitolproduktion beträgt $0,08 \text{ g g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel. Im integrierten Verfahren lag die Ausbeute der L-Arabinose bei 83,3 %, was $0,18 \text{ g L-Arabinose g}^{-1}$ Zuckerrübenpressschnitzel entspricht.

Auch wenn der automatisierte Begasungsstopp bei beiden Prozessen mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat funktionierte, um eine D-Xylitolverstoffwechselung zu verhindern, erfolgte er in beiden Fällen zu früh. Der Grenzwert der CO_2 -Konzentration im Abgas ist abhängig von den Betriebsbedingungen im Rührkesselreaktor und muss für jede Bedingung individuell bestimmt werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die nachhaltige Produktion biotechnologischer Produkte gewinnt insbesondere im Kontext des Klimawandels zunehmend an Bedeutung. Eine wachsende Weltbevölkerung führt zu steigendem Konsum und erhöhtem Nahrungsmittelbedarf. Gleichzeitig erfordern Klimaschutzmaßnahmen eine Reduktion der Kohlenstoffdioxidemissionen sowie eine schrittweise Abkehr von petrochemischen Prozessen (Barros et al., 2020; Holechek et al., 2022; Toop et al., 2017). Die Biotechnologie bietet vielversprechende Lösungen, insbesondere durch die Nutzung von Agrarreststoffen für die biotechnologische Produktion. Ein entscheidender Vorteil dieser Rohstoffe ist, dass sie nicht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion stehen (Chen & Önal, 2016; Koul et al., 2022; Sarkar et al., 2012).

Ein vielversprechender Agrarreststoff sind Zuckerrübenpressschnitzel, ein Nebenprodukt der Zuckerproduktion (Muir & Anderson, 2021). Um Zuckerrübenpressschnitzel biotechnologisch nutzbar zu machen, müssen die enthaltenen Zuckermomere zunächst durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden. Diese Zucker können anschließend mithilfe genetisch modifizierter Mikroorganismen weiterverwertet werden. In Voruntersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass der gentechnisch modifizierter *Aspergillus niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ -Stamm zur enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel eingesetzt werden kann. In diesen Vorarbeiten wurde auch ein Verfahren zur Integration von Enzymherstellung und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolyse in einem Rührkesselreaktor untersucht. (Schäfer, 2022) Eine Herausforderung besteht darin, hohe Zuckerkonzentrationen zu erreichen, um eine effiziente Weiterverarbeitung sicherzustellen und maximale Produktausbeuten zu erzielen. Dies kann durch die Verwendung höherer Feststoffkonzentrationen während der Hydrolyse erreicht werden. Ein Ziel dieser Arbeit war, ein integriertes Verfahren von Enzymherstellung im feuchten Haufwerk von Zuckerrübenpressschnitzel und Hydrolyse mit möglichst hohen Zuckerkonzentrationen zu ermöglichen.

Das durch enzymatische Hydrolyse gewonnene Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat bietet vielseitige Verwertungsmöglichkeiten für die biotechnologische Produktion unterschiedlicher Wertstoffe. Bisherige Studien zeigten bereits, dass die freigesetzte D-Galakturonsäure mithilfe genetisch modifizierter *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme zur Plattformchemikalie L-Galaktonat umgewandelt werden kann (Harth et al., 2020; Wagner et al., 2021). Zur erweiterten Nutzung des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats bietet sich auch die Verwertung von L-Arabinose für weitere Biotransformationen an.

Eine der drei Hauptkomponenten in Zuckerrübenschnitzel, neben D-Glukose und D-Galakturonsäure, ist L-Arabinose. Durch gezielte Deletionen im Pentose-Katabolismus kann *A. niger* so modifiziert werden, dass D-Xylitol nicht weiter verstoffwechselt, sondern angereichert wird (Chroumpi et al., 2021; Meng et al., 2022; Rüllke, Schönrock et al., 2024). Bei der Herstellung von D-Xylitol aus Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat können die anderen Zucker zum Wachstum von *A. niger* genutzt werden.

Zusammenfassend waren die Ziele dieser Arbeit, eine effiziente enzymatische Hydrolyse mit hohen Feststoffkonzentrationen zu etablieren und die freigesetzten Zucker für die Biotransformation von L-Arabinose zu D-Xylitol mit gentechnisch modifizierten *A. niger*-Stämmen zu nutzen.

Zu Beginn wurde die Eignung von zwei unterschiedlichen Zuckerrübenpressschnitzel-Partikelgrößen für die Feststofffermentation im feuchten Haufwerk mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ untersucht. Hierbei zeigte sich, dass gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel (mittlere Partikelgröße 0,6 mm) für die Enzymproduktion im feuchten Haufwerk ungeeignet sind, da sie während des Satzprozesses durch die enzymatische Hydrolyse zersetzt wurden. Dadurch verflüssigte sich das feuchte Haufwerk zu einer Suspension, wodurch die Sauerstoffversorgung im Substrat schwierig wurde. Im Gegensatz dazu erwiesen sich nicht gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel (mittlere Partikelgröße 2,8 mm) als deutlich besser geeignet. Das feuchte Haufwerk mit 281 g L⁻¹ Schüttung behielt während der Feststofffermentation mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ die Struktur. Somit konnte mit der eingesetzten Oberflächenbegasung über den Kopfraum des Bioreaktors die kontinuierliche Gasphase zur Sauerstoffversorgung von *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ dienen. Die Zuluft erfolgte mit wasserdampfgesättigter Luft, um ein Austrocknen der Pressschnitzel zu verhindern. Zudem war das Homogenisieren aufgrund von Verdichtungseffekten nicht mehr möglich, weshalb die Inokulation manuell stattfand und das mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ -Sporen inokulierte Haufwerk steril in einer Sterilwerkbank in den zylindrischen Laborreaktor gefüllt wurde. Dieser *A. niger*-Stamm war genetisch optimiert für eine erhöhte Polygalakturonase (PGase)-Sekretion. Nach 115 h Enzymproduktion wurden mit diesem Verfahren PGase-Aktivitäten von 128,9 – 165,3 U g⁻¹ Zuckerrübenpressschnitzel erreicht.

Die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse im zweiten Prozessschritt des integrierten Verfahrens wurde in Parameterstudien durchgeführt. Hierfür wurden die Enzyme nach der Enzymproduktion im zylindrischen Bioreaktor durch Zugabe von 980 mL Wasser und Homogenisieren (100 min⁻¹) in der Flüssigphase gelöst. Der zylindrische Bioreaktor mit dem feuchten Haufwerk war mit Rührorganen ausgestattet. Die Rührorgane Ankerrührer, Einfachhelixrührer und Schrägblattrührer waren von unten

nach oben an der Rührwelle montiert. Der Überstand mit den hydrolytischen Enzymen wurde für Parameterstudien in gerührte 100-mL-Laborflaschen überführt. In den Parallelversuchen wurden die Konzentration (30 g L^{-1} oder 50 g L^{-1} gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel), der pH (pH 3 – 5) und die Temperatur ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) variiert. Die Zuckerrübenpressschnitzel wurden vor Verwendung mit Puffer beim jeweiligen pH hitzesterilisiert und nach Zugabe des Enzymüberstands für 49 h inkubiert. Anschließend wurden die aus den Zuckerrübenpressschnitzel freigesetzten Zuckerkonzentrationen D-Glukose, L-Arabinose, D-Galakturonsäure und D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose (XMG) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass durch die Hitzesterilisation bereits 40 % D-Glukose und abhängig vom pH zwischen 20 – 60 % L-Arabinose und 30 – 60 % D-Galakturonsäure freigesetzt worden waren. Die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen von $29,3 \text{ g L}^{-1}$ wurden bei 50 g L^{-1} eingesetzten gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel erreicht. Für die Hydrolyse erwiesen sich pH 4,5 und $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ als sinnvolle Parameter.

Die Enzymproduktion im feuchten Haufwerk unter den ermittelten Bedingungen, mit einer Schüttung von 281 g L^{-1} Zuckerrübenpressschnitzel und *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$, führte nach 96 h zu PGase-Aktivitäten von $911,6 \pm 133,9 \text{ U g}^{-1}$ oder $747,5 \pm 15 \text{ U g}^{-1}$. Die Enzymproduktion erfolgte bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und das feuchte Haufwerk war bei pH 4,5 gepuffert. Die anschließend Hydrolyse bei pH 4,5 und $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde durch die Zugabe von 1,715 L Wasser und Einschalten der Rührer (220 min^{-1}) gestartet. Nach 24 h Resthydrolyse der übrigen Zuckerrübenschnitzel aus der Enzymproduktion erfolgte die Zugabe von 220 g gemahlener, zuvor mit 200 mL Wasser autoklavierter Zuckerrübenpressschnitzel. Die Analyse der Biotrockenmassekonzentration während der enzymatischen Hydrolyse zeigte eine Reduktion der zugesetzten gemahlene Zuckerrübenpressschnitzel um 48 % innerhalb von 144 h. Nach 166 h Hydrolyse wurden Endkonzentrationen von 17 g L^{-1} D-Glukose, $18,8 \text{ g L}^{-1}$ L-Arabinose, $12,5 \text{ g L}^{-1}$ D-Galakturonsäure und $6,5 \text{ g L}^{-1}$ D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose erreicht. Dies entspricht einer Gesamtzuckerkonzentration von $54,8 \text{ g L}^{-1}$. Die finalen Ausbeuten betrugen 61 % D-Glukose, 86 % L-Arabinose, 50 % D-Galakturonsäure und 71 – 75 % D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose.

Bei direkter Zuckerrübenpressschnitzel-Zugabe zu Beginn der Hydrolyse im integrierten Prozess erhöhte sich die D-Galakturonsäureausbeute auf 66 % und die D-Glukoseausbeute verringerte sich auf 53 %. Die Endkonzentrationen von L-Arabinose, D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose blieben unverändert, jedoch wurde die Sättigung früher erreicht. Dieser Satzprozess führte zu einer Gesamtzuckerkonzentration von $53,9 \text{ g L}^{-1}$.

Zur Nutzung des produzierten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats war zunächst die reaktionstechnische Charakterisierung gentechnisch modifizierter *A. niger*-Stämme zur D-Xylitolproduktion im kontrollierten Rührkesselreaktor notwendig. Zwei modifizierte *A. niger*-Stämme wurden vom Projektpartner von der Professur für Pilzbiotechnologie in den Holzwissenschaften (Technischen Universität München, Prof. J. Philipp Benz) bereitgestellt und zunächst in synthetischem Medium charakterisiert. Beide Stämme basierten auf dem Parentalstamm *A. niger* NRRL3 und enthielten gezielte genetische Deletionen von Enzymen des L-Arabinose-Stoffwechselwegs, um das gebildete D-Xylitol zu akkumulieren. Der erste Stamm enthielt Deletionen der Gene für die D-Xylitol-Dehydrogenase (XdhA), D-Sorbitol-Dehydrogenase (SdhA), D-Xylulose-Kinase (XkiA) und der zweite Stamm enthielt zusätzlich noch den Fps1-Transporter zur Steigerung des D-Xylitol Exports aus *A. niger*. Die beiden Stämme wurden in Satzprozessen mit 6 g L⁻¹ D-Glukose als Kohlenstoffquelle und 10 g L⁻¹ L-Arabinose als Edukt kultiviert. Der Stamm ohne Transporter erreichte nur eine maximale D-Xylitol-Konzentration von 0,2 g L⁻¹, wohingegen der Fps1-Transporter-Stamm eine maximale Konzentration von 2,6 g L⁻¹ erreichte. Der Fps1-Transporter-Stamm *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtvDA-FPS1_{open}* wurde daher zur D-Xylitolproduktion ausgewählt. Nach dem vollständigen Verbrauch von L-Arabinose wurde das gebildete D-Xylitol allerdings wieder verstoffwechselt.

Um dies zu verhindern wurde, wie bereits zuvor, eine Inaktivierung des Stoffwechsels von *A. niger* durch Abschalten der Begasung untersucht. Als Zeitpunkt für das Stoppen der Zuluft wurde der Zeitpunkt der vollständigen L-Arabinose Umsetzung gewählt. Dieser Zeitpunkt wurde im ersten Satzprozess nach 60 h für *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtvDA-FPS1_{open}* erreicht. Dabei zeigte sich, dass in dem zweiten Satzprozess mit Begasungsstopp nach 60 h der Zeitpunkt zu früh gewählt war, da noch L-Arabinose vorhanden war. Jedoch wurde die Verstoffwechselung des gebildeten Produktes D-Xylitol durch Abschalten der Begasung erfolgreich beendet. Die finale D-Xylitolkonzentration betrug 2,1 g L⁻¹ mit einer Ausbeute von 22,6 %.

Die manuelle Abschaltung der Begasung stellte sich als problematisch heraus, da während des Satzprozesses keine Messdaten der L-Arabinosekonzentration verfügbar sind. Die CO₂-Konzentration im Abgas fällt jedoch stark ab, sobald L-Arabinose verbraucht ist.

Mit synthetischem Medium wurde ein automatischer Begasungsstopp bei konstanter Begasung mit 0,2 vvm implementiert, sobald ein Schwellenwert von 0,6 % CO₂-Konzentration im Abgas unterschritten wurde. Nach dem Unterschreiten dieser Konzentration wurde der Rührkesselreaktor zusätzlich für 2 min mit Stickstoff

anaerobisiert. Zum Zeitpunkt des automatischen Abschaltens der Begasung waren nur noch $0,7 \text{ g L}^{-1}$ L-Arabinose im Medium vorhanden, sodass 95 % der eingesetzten L-Arabinose metabolisiert wurde. In diesen Satzprozessen wurden finale D-Xylitol-Konzentrationen von $4,6 \text{ g L}^{-1}$ mit Ausbeuten von $0,36 - 0,37 \text{ g D-Xylitol g}^{-1}$ L-Arabinose erzielt.

Beim Einsatz von dem im integrierten Prozess produzierten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat stellte sich heraus, dass weder Wachstum noch Produktbildung von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *PtdA-FPS1*_{open} zu beobachten waren. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Verdünnungen des Hydrolysats im Medium konnte erst ab einer Verdünnung auf 25 % Hydrolysat Wachstum von *A. niger* beobachtet werden. Daraufhin wurde eine Aktivkohle-Behandlung zur Entfernung von inhibitorischen Substanzen untersucht. Als geeignet erwies sich der Einsatz von 88 g dampfaktivierter Aktivkohle pro Liter Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat.

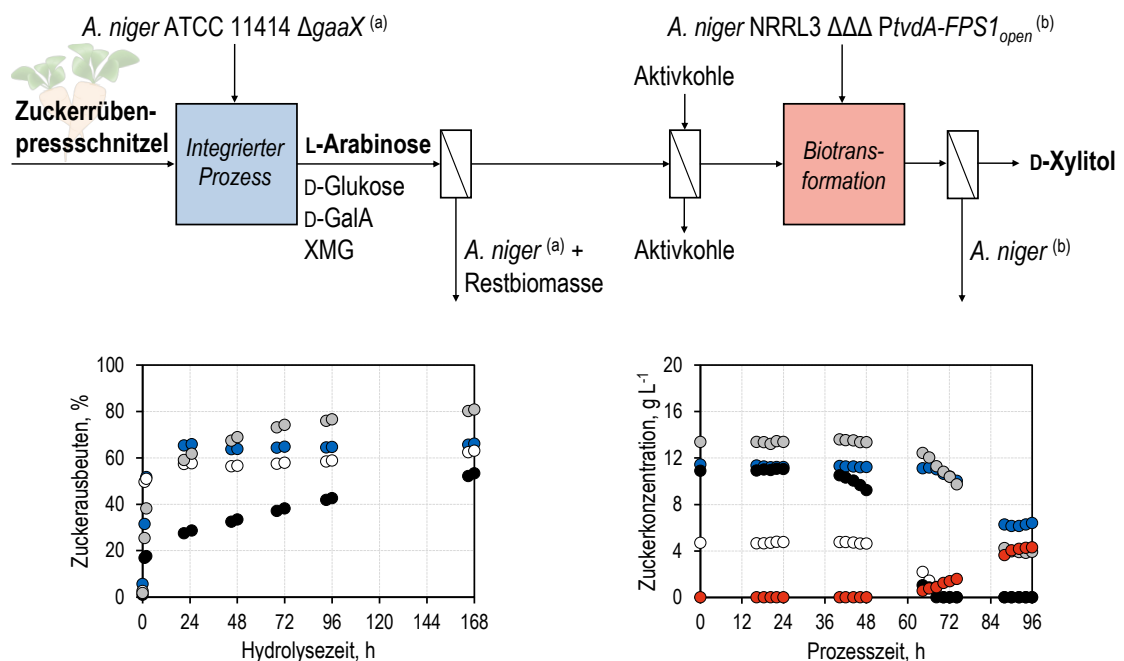


Abbildung 7.1: Prozessschema zur Herstellung von D-Xylitol aus Zuckerrübenpressschnitzeln (oben). Darstellung der Zuckerausbeuten D-Glukose (schwarz), L-Arabinose (grau), D-Galakturonsäure (D-GalA: blau), gesammelte D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose (XMG: weiß) während der Hydrolyse (Diagramm unten links) und der Umsetzung des mit Aktivkohle vorbehandelten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats mit *A. niger* zu D-Xylitol (rot) mit automatisierter Abschaltung der Begasung nach 96 h (Diagramm unten rechts).

Dieser Adsorptionsprozess führte auch zur Entfärbung des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats mit Zuckerausbeuten von 95,5 % D-Glukose, 95,7 % L-Arabinose, 92,8 % D-Galakturonsäure sowie 98,2 % D-Xylose, D-Mannose und D-Galaktose. Im Satzprozess mit aktivkohlebehandeltem Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat wurde

zum automatisierten Begasungsstopp ein Schwellenwert von 0,9 % CO₂-Anteil im Abgas vorgegeben. Innerhalb von 96 h wurde eine finale D-Xylitol-Konzentration von 4,3 g L⁻¹ mit einer Ausbeute von 0,45 g g⁻¹ erreicht. Allerdings erfolgte die Auslösung des Begasungsstopp zu früh, da noch L-Arabinose im Medium vorlag.

Insgesamt konnte ein integrierter Prozess zur Enzymproduktion mit *A. niger* ATCC 11414 Δ *gaaX* und enzymatischer Hydrolyse von Zuckerrübenpressschnitzel in einem Bioreaktor mit hohen Zuckerkonzentrationen erfolgreich etabliert werden (siehe Abbildung 7.1). Die L-Arabinose aus dem produzierten Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat konnte nach einer Aktivkohle-Behandlung für die Produktion von D-Xylitol durch *A. niger* NRRL3 Δ *xdhA*, Δ *sdhA*, Δ *xkiA* *PtdA-FPS1*_{open} mit einer Ausbeute von 0,45 g D-Xylitol g⁻¹ L-Arabinose genutzt werden.

Ausblick

Eine gezielte Aufkonzentrierung der Zuckerlösung, entweder vor oder nach der Aktivkohlebehandlung, stellt einen Ansatz zur Effizienzsteigerung des Prozesses dar. Durch die Aufkonzentrierung wird das zu verarbeitende Volumen reduziert, wodurch der Aufwand in nachgelagerten Prozessschritten verringert wird. Dies führt zudem zu einer Senkung der Betriebskosten, insbesondere durch den geringeren Energie- und Materialbedarf.

Zur Erhöhung der Ausbeuten sind gentechnische Modifikationen des D-Xylitol-produzierenden *A. niger*-Stamms erforderlich, sodass L-Arabinose bevorzugt in die D-Xylitolbildung eingeht. Zudem können umfassende Stoffflussanalysen helfen, zentrale metabolische Engpässe zu identifizieren, die gezielt über weitere Genmodifizierungen adressiert werden können.

Neben der Erhöhung der Ausbeuten stellt die Entwicklung geeigneter Isolationsmethoden von D-Xylitol einen wichtigen Aspekt dar. Bewährte Verfahren wie Extraktion, Chromatographie und anschließende Kristallisation bieten sich für die effiziente Abtrennung des Produkts an (Martínez et al., 2015; Misra et al., 2011). Durch die Optimierung des Trennverfahrens könnten nicht nur die Produktionskosten gesenkt, sondern auch die Reinheit von D-Xylitol für spezifische Anwendungen, etwa in der Lebensmittelindustrie oder in der Medizin, gewährleistet werden.

8. Literaturverzeichnis

- Aarabi, A., Mizani, M. & Honarvar, M. (2017). The use of sugar beet pulp lignin for the production of vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.004>
- Abraham, J., Gea, T., Komilis, D. & Sánchez, A. (2017). Reproducibility of solid-state fermentation at bench-scale: the case of protease production. *Global NEST Journal*, 19(2), 183–190. <https://doi.org/10.30955/gnj.002120>
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R. & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in life sciences*, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Antranikian, G. (2006). *Angewandte Mikrobiologie. SpringerLink Bücher*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/3-540-29456-2>
- Arjeh, E., Khodaei, S. M., Barzegar, M., Pirsá, S., Karimi Sani, I., Rahati, S. & Mohammadi, F. (2022). Phenolic compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties. *Food Science & Nutrition*, 10(12), 4238–4246. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3017>
- Arora, S., Rani, R. & Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 269, 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Bala, A. & Singh, B. (2015). Cost-effective production of biotechnologically important hydrolytic enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(1), 181–191. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1502-8>
- Barros, M. V., Salvador, R., Francisco, A. C. de & Piekarski, C. M. (2020). Mapping of research lines on circular economy practices in agriculture: From waste to energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 109958. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109958>
- Bauer, S., Vasu, P., Persson, S., Mort, A. J. & Somerville, C. R. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604632103>
- Berłowska, J., Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Dziekońska-Kubczak, U., Patelski, P., Dziugan, P. & Kręgiel, D. (2016). Simultaneous Saccharification and

- Fermentation of Sugar Beet Pulp for Efficient Bioethanol Production. *BioMed research international*, 2016, 3154929. <https://doi.org/10.1155/2016/3154929>
- Bernal, M., Ruiz, M. O., Geanta, R. M., Benito, J. M. & Escudero, I. (2016). Colour removal from beet molasses by ultrafiltration with activated charcoal. *Chemical Engineering Journal*, 283, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.047>
- Bindereif, B., Karbstein, H. P., Zahn, K. & van der Schaaf, U. S. (2022). Effect of Conformation of Sugar Beet Pectin on the Interfacial and Emulsifying Properties. *Foods*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/foods11020214>
- Bolaño Losada, C., Slaný, O., Byrtusová, D., Zimmermann, B., Horn, S. J., Kohler, A. & Shapaval, V. (2025). Compatible traits of oleaginous Mucoromycota fungi for lignocellulose-based simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 18(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02621-w>
- Bonnin, E. & Pelloux, J. (2020). Pectin Degrading Enzymes. In V. Kontogiorgos (Hrsg.), *Pectin: Technological and Physiological Properties* (S. 37–60). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_3
- Brijwani, K. & Vadlani, P. V. (2011). Cellulolytic Enzymes Production via Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. *Enzyme research*, 2011, 860134. <https://doi.org/10.4061/2011/860134>
- Brink, D. P., Ravi, K., Lidén, G. & Gorwa-Grauslund, M. F. (2019). Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(10), 3979–4002. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09692-4>
- Cairns, T. C., Barthel, L. & Meyer, V. (2021). Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays in biochemistry*, 65(2), 213–224. <https://doi.org/10.1042/EBC20200139>
- Cairns, T. C., Nai, C. & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Cárdenas-Fernández, M., Hamley-Bennett, C., Leak, D. J. & Lye, G. J. (2018). Continuous enzymatic hydrolysis of sugar beet pectin and l-arabinose recovery within an integrated biorefinery. *Bioresource Technology*, 269, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.069>

- Castilho, L. R., Medronho, R. A. & Alves, T. L.M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45–50.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00058-9)
- Cen, P. & Xia, L. (1999). Production of Cellulase by Solid-State Fermentation. In T. Scheper, W. Babel, H. W. Blanch, C. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klibanov, B. Mattiasson, S. B. Primrose, H. J. Rehm, P. L. Rogers, H. Sahm, K. Schügerl, G. T. Tsao, K. Venkat, J. Villadsen, U. von Stockar, C. Wandrey, . . . L. Xia (Hrsg.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics* (Bd. 65, S. 69–92). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-49194-5_4
- Chamy, R., Illanes, A., Aroca, G. & Nuñez, L. (1994). Acid hydrolysis of sugar beet pulp as pretreatment for fermentation. *Bioresource Technology*, 50(2), 149–152.
[https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90067-1)
- Chen, X. & Önal, H. (2016). Renewable energy policies and competition for biomass: Implications for land use, food prices, and processing industry. *Energy Policy*, 92, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2016.02.022>
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D. & Chen, C. (2007). Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(3), 276–290. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0026-3>
- Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438–443.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)
- Chmelová, D., Legerská, B., Kunstová, J., Ondrejovič, M. & Miertuš, S. (2022). The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World journal of microbiology & biotechnology*, 38(2), 21.
<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03207-y>
- Chmiel, H. & Weuster-Botz, D. (2018). Bioreaktoren. In H. Chmiel, R. Takors & D. Weuster-Botz (Hrsg.), *Bioprozesstechnik* (4. Aufl. 2018, S. 157–229). Springer Berlin Heidelberg.
- Chroumpi, T., Peng, M., Aguilar-Pontes, M. V., Müller, A., Wang, M., Yan, J., Lipzen, A., Ng, V., Grigoriev, I. V., Mäkelä, M. R. & Vries, R. P. de (2021). Revisiting a 'simple' fungal metabolic pathway reveals redundancy, complexity and diversity. *Microbial Biotechnology*, 14(6), 2525–2537. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13790>

- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., Blecker, C., Devaux, J. & Paquot, M. (2013). Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 148–156.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.006>
- Datta, R. (2024). Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. *Heliyon*, 10(1), e24022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022>
- Delgado Arcaño, Y., Valmaña García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A. & Magalhães Pontes, L. A. (2020). Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*, 344, 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>
- Devos, R. J. B. & Colla, L. M. (2022). Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: A bibliometric and systematic study. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100924. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100924>
- Diano, A., Peeters, J., Dynesen, J. & Nielsen, J. (2009). Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: Influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(5), 956–965. <https://doi.org/10.1002/bit.22329>
- Dilly, O. (2001). Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00123-1)
- Dilly, O. (2003). Regulation of the respiratory quotient of soil microbiota by availability of nutrients. *FEMS microbiology ecology*, 43(3), 375–381.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01078.x>
- Dilly, O. (2004). Effects of glucose, cellulose, and humic acids on soil microbial eco-physiology. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167(3), 261–266.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200321041>
- Driouch, H., Sommer, B. & Wittmann, C. (2010). Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(6), 1058–1068. <https://doi.org/10.1002/bit.22614>
- Dyer, P. S. & O'Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Current opinion in microbiology*, 14(6), 649–654.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001>

- Dygas, D., Kręgiel, D. & Berłowska, J. (2023). Sugar Beet Pulp as a Biorefinery Substrate for Designing Feed. *Molecules*, 28(5), 2064. <https://doi.org/10.3390/molecules28052064>
- Farinas, C. S., Loyo, M. M., Baraldo, A., Tardioli, P. W., Neto, V. B. & Couri, S. (2010). Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New biotechnology*, 27(6), 810–815. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.001>
- Fayet, A., Teixeira, A. R.S., Allais, F., Bouix, M. & Lameloise, M.-L. (2018). Detoxification of highly acidic hemicellulosic hydrolysate from wheat straw by diananofiltration with a focus on phenolic compounds. *Journal of Membrane Science*, 566, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.08.045>
- Fernandes, M. A., Mota, M. N., Faria, N. T. & Sá-Correia, I. (2023). An Evolved Strain of the Oleaginous Yeast *Rhodotorula toruloides*, Multi-Tolerant to the Major Inhibitors Present in Lignocellulosic Hydrolysates, Exhibits an Altered Cell Envelope. *Journal of Fungi*, 9(11), 1073. <https://doi.org/10.3390/jof9111073>
- Ferrari, R., Gautier, V. & Silar, P. (2021). *Lignin degradation by ascomycetes* (Advances in Botanical Research). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.006>
- Finkenstadt, V. L. (2014). A Review on the Complete Utilization of the Sugarbeet. *Sugar Tech*, 16(4), 339–346. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0285-y>
- Fuchs, G. & Schlegel, H.-G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie* (8 Aufl.). Georg Thieme Verlag KG.
- García-Velásquez, C. & van der Meer, Y. (2023). Mind the Pulp: Environmental and economic assessment of a sugar beet pulp biorefinery for biobased chemical production. *Waste Management*, 155, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.10.038>
- Gasmi Benahmed, A., Gasmi, A., Arshad, M., Shanaida, M., Lysiuk, R., Peana, M., Pshyk-Titko, I., Adamiv, S., Shanaida, Y. & Bjørklund, G. (2020). Health benefits of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(17), 7225–7237. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10708-7>
- Geysens, S., Whyteside, G. & Archer, D. B. (2009). Genomics of protein folding in the endoplasmic reticulum, secretion stress and glycosylation in the aspergilli. *Fungal Genetics and Biology*, 46(1), S121-S140. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.016>

- Gikas, P., Zhu, B., Batistatos, N. I. & Zhang, R. (2018). Evaluation of the rotary drum reactor process as pretreatment technology of municipal solid waste for thermophilic anaerobic digestion and biogas production. *Journal of environmental management*, 216, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.050>
- Glaser, S. J., Abdelaziz, O. Y., Demoit  , C., Galbe, M., Pyo, S.-H., Jensen, J. P. & Hatti-Kaul, R. (2022). Fractionation of sugar beet pulp polysaccharides into component sugars and pre-feasibility analysis for further valorisation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(3), 3575–3588. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02699-4>
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D. & Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual review of microbiology*, 67, 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- Godley, A. R. (2004). Factors Affecting the Soil Microbial Quality Measurements of Biomass Quotient and Respiration Quotient. *Water and Environment Journal*, 18(2), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2004.tb00500.x>
- Gomes, J., Zeni, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H. & Valduga, E. (2011). Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.002>
- Gowthaman, M.K., Krishna, C. & Moo-Young, M. (2001). Fungal solid state fermentation — An overview. *Agriculture and Food Production, Elsevier*, 305–352.
- Gruska, R. M., Baryga, A., Kunicka-Styczyńska, A., Brzeziński, S., Rosicka-Kaczmarek, J., Miśkiewicz, K. & Sumińska, T. (2022). Fresh and Stored Sugar Beet Roots as a Source of Various Types of Mono- and Oligosaccharides. *Molecules*, 27(16). <https://doi.org/10.3390/molecules27165125>
- G  nan Yücel, H. & Aksu, Z. (2015). Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793–799. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.016>
- Harth, S., Wagner, J., Sens, T., Choe, J.-y., Benz, J. P., Weuster-Botz, D. & Oreb, M. (2020). Engineering cofactor supply and NADH-dependent d-galacturonic acid reductases for redox-balanced production of l-galactonate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75926-5>
- Hille, A., Neu, T. R., Hempel, D. C. & Horn, H. (2009). Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(6), 1202–1213. <https://doi.org/10.1002/bit.22351>

- Hoffmann, C. M., Huijbregts, T., van Swaaij, N. & Jansen, R. (2009). Impact of different environments in Europe on yield and quality of sugar beet genotypes. *European Journal of Agronomy*, 30(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.06.004>
- Holechek, J. L., Geli, H. M. E., Sawalhah, M. N. & Valdez, R. (2022). A Global Assessment: Can Renewable Energy Replace Fossil Fuels by 2050? *Sustainability*, 14(8), 4792. <https://doi.org/10.3390/su14084792>
- Hortsch, R. & Corvo, P. (2020). The Biorefinery Concept: Producing Cellulosic Ethanol from Agricultural Residues. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1803–1809. <https://doi.org/10.1002/cite.202000203>
- Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P. & Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. *Biomass and Bioenergy*, 134, 105481. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>
- Hutnan, M., Drtil, M. & Mrafkova, L. (2000). Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp. *Biodegradation*, 11(4), 203–211. <https://doi.org/10.1023/A:1011139621329>
- Infors AG (Hrsg.). (2021). *Operating Manual Labfors 5: Bench-Top Bioreactor - Version for Solid Substrates and Enzymatic Bioprocesses*.
- Iram, A., Cekmecelioglu, D. & Demirci, A. (2022). Integrating 1G with 2G Bioethanol Production by Using Distillers' Dried Grains with Solubles (DDGS) as the Feedstock for Lignocellulolytic Enzyme Production. *Fermentation*, 8(12), 705. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120705>
- Jayani, R. S., Saxena, S. & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- Johnson, E. (2016). Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(2), 164–174. <https://doi.org/10.1002/bbb.1634>
- Juturu, V. & Wu, J. C. (2013). Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(3), 353–363. <https://doi.org/10.1002/jctb.3969>
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)

- Knesebeck, M., Rüllke, M., Schönrock, V., Benz, J. P. & Weuster-Botz, D. (2024). D-Xylitol Production from Sugar Beet Press Pulp Hydrolysate with Engineered *Aspergillus niger*. *Microorganisms*, 12(12).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12122489>
- Knesebeck, M., Schäfer, D., Schmitz, K., Rüllke, M., Benz, J. P. & Weuster-Botz, D. (2023). Enzymatic One-Pot Hydrolysis of Extracted Sugar Beet Press Pulp after Solid-State Fermentation with an Engineered *Aspergillus niger* Strain. *Fermentation*, 9(7), 582. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070582>
- Komarova, M. I., Semenova, M. V., Volkov, P. V., Shashkov, I. A., Rozhkova, A. M., Zorov, I. N., Kurzeev, S. A., Satrutdinov, A. D., Rubtsova, E. A. & Sinitsyn, A. P. (2025). Efficient Hydrolysis of Sugar Beet Pulp Using Novel Enzyme Complexes. *Agronomy*, 15(1), 101. <https://doi.org/10.3390/agronomy15010101>
- Koul, B., Yakoob, M. & Shah, M. P. (2022). Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. *Environmental Research*, 206, 112285.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112285>
- Kowalczyk, J. E., Lubbers, R. J. M., Peng, M., Battaglia, E., Visser, J. & Vries, R. P. de (2017). Combinatorial control of gene expression in *Aspergillus niger* grown on sugar beet pectin. *Scientific Reports*, 7(1), 12356. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12362-y>
- Kracher, D., Oros, D., Yao, W., Preims, M., Rezic, I., Haltrich, D., Rezic, T. & Ludwig, R. (2014). Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnology journal*, 9(4), 483–492. <https://doi.org/10.1002/biot.201300214>
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J. & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 74(1), 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T. R. & Nörtemann, B. (2010). Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 121, 1–21. https://doi.org/10.1007/10_2009_60
- Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B. & Engh, I. (2009). *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung* (3. Aufl.). Springer.
- Kühnel, S., Schols, H. A. & 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(1).
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-14>

- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K. & Singhania, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Kunitake, E., Uchida, R., Asano, K., Kanamaru, K., Kimura, M., Kimura, T. & Kobayashi, T. (2022). cAMP signaling factors regulate carbon catabolite repression of hemicellulase genes in *Aspergillus nidulans*. *AMB Express*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01467-x>
- Kunz, S., Wach, W. & Kraus, W. (2020). Biorefinery Zeitz of the Südzucker Group – Status Quo and Future Perspectives. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1752–1763. <https://doi.org/10.1002/cite.202000061>
- Lamy, E., Tran, T. C., Mottelet, S., Pauss, A. & Schoefs, O. (2013). Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.015>
- Leijdekkers, A.G.M., Bink, J.P.M., Geutjes, S., Schols, H. A. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.126>
- Levigne, S., Ralet, M.-C. & Thibault, J.-F. (2002). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00314-9)
- Li, G., Sun, Y., Guo, W. & Yuan, L. (2018). Comparison of various pretreatment strategies and their effect on chemistry and structure of sugar beet pulp. *Journal of Cleaner Production*, 181, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.259>
- Li, J., Chroumpi, T., Garrigues, S., Kun, R. S., Meng, J., Salazar-Cerezo, S., Aguilar-Pontes, M. V., Zhang, Y., Tejomurthula, S., Lipzen, A., Ng, V., Clendinen, C. S., Tolić, N., Grigoriev, I. V., Tsang, A., Mäkelä, M. R., Snel, B., Peng, M. & Vries, R. P. de (2022). The Sugar Metabolic Model of *Aspergillus niger* Can Only Be Reliably Transferred to Fungi of Its Phylum. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/jof8121315>
- Lima, M. A., Da Oliveira, M. C. de, Pimenta, A. & Uchôa, P. (2019). *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. *Journal of the*

- Brazilian Chemical Society*. Vorab-Onlinepublikation.
<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190080>
- Lin, J., Tang, Z.-S., Brennan, C. S., Chandrapala, J., Gao, W., Han, Z. & Zeng, X.-A. (2023). Valorizing protein-polysaccharide conjugates from sugar beet pulp as an emulsifier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 226, 679–689.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.217>
- Lin, X., Alspaugh, J. A., Liu, H. & Harris, S. (2014). Fungal morphogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(2), a019679.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019679>
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M. & Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO journal*, 14(7), 1360–1371. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07122.x>
- Ma, X., Gao, M., Li, Y., Wang, Q. & Sun, X. (2022). Production of cellulase by *Aspergillus niger* through fermentation of spent mushroom substance: Glucose inhibition and elimination approaches. *Process Biochemistry*, 122, 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.09.029>
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2011). *Brock Mikrobiologie* (11., aktualis. Aufl. 2009). *Bio Biologie*. Pearson Studium.
- Maehara, L., Pereira, S. C., Silva, A. J. & Farinas, C. S. (2018). One-pot strategy for on-site enzyme production, biomass hydrolysis, and ethanol production using the whole solid-state fermentation medium of mixed filamentous fungi. *Biotechnology Progress*, 34(3), 671–680. <https://doi.org/10.1002/btpr.2619>
- Martínez, E. A., Canettieri, E. V., Bispo, J. A. C., Giulietti, M., Almeida e Silva, J. B. de & Converti, A. (2015). Strategies for xylitol purification and crystallization: A Review. *Separation Science and Technology*, 57(7), 150527095459001.
<https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1009115>
- Martins, C., Hartmann, D. O., Varela, A., Coelho, J. A. S., Lamosa, P., Afonso, C. A. M. & Silva Pereira, C. (2020). Securing a furan-based biorefinery: disclosing the genetic basis of the degradation of hydroxymethylfurfural and its derivatives in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbial Biotechnology*, 13(6), 1983–1996.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13649>
- Martins, L. C., Palma, M., Angelov, A., Nevoigt, E., Liebl, W. & Sá-Correia, I. (2021). Complete Utilization of the Major Carbon Sources Present in Sugar Beet Pulp

- Hydrolysates by the Oleaginous Red Yeasts *Rhodotorula toruloides* and *R. mucilaginosa*. *Journal of Fungi*, 7(3), 215. <https://doi.org/10.3390/jof7030215>
- Marzo-Gago, C., Díaz, A. B. & Blandino, A. (2023). Sugar Beet Pulp as Raw Material for the Production of Bioplastics. *Fermentation*, 9(7), 655. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070655>
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12(7), 409–417. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00032-9)
- Mathur, S., Kumar, D., Kumar, V., Dantas, A., Verma, R. & Kuca, K. (2023). Xylitol: Production strategies with emphasis on biotechnological approach, scale up, and market trends. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 35, 101203. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101203>
- Matsuzawa, T., Watanabe, A., Shintani, T., Gomi, K. & Yaoi, K. (2021). Enzymatic degradation of xyloglucans by *Aspergillus* species: a comparative view of this genus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(7), 2701–2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11236-8>
- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M.-R. & Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Meng, J., Chroumpi, T., Mäkelä, M. R. & Vries, R. P. de (2022). Xylitol production from plant biomass by *Aspergillus niger* through metabolic engineering. *Bioresource Technology*, 344, 126199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126199>
- Meng, X. & Ragauskas, A. J. (2014). Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.014>
- Meyer, V., Cairns, T., Barthel, L., King, R., Kunz, P., Schmieder, S., Müller, H., Briesen, H., Dinius, A. & Krull, R. (2021). Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. *Fungal Biology and Biotechnology*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00115-6>
- Micard, V., Renard, C.M.G.C. & Thibault, J.-F. (1994). Studies on Enzymic Release of Ferulic Acid from Sugar-Beet Pulp. *LWT - Food Science and Technology*, 27(1), 59–66. <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1013>

- Micard, V., Renard, C.M.G.C. & Thibault, J.-F. (1996). Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 162–170.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00224-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00224-3)
- Misra, S., Gupta, P., Raghuwanshi, S., Dutt, K. & Saxena, R. K. (2011). Comparative study on different strategies involved for xylitol purification from culture media fermented by *Candida tropicalis*. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.02.018>
- Mitchell, D. A., Krieger, N., Stuart, D. M. & Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 35(10), 1211–1225.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00157-6)
- Mitchell, D. A., Pitol, L. O., Biz, A., Finkler, A. T. J., Lima Luz, L. F. de & Krieger, N. (2019). Design and Operation of a Pilot-Scale Packed-Bed Bioreactor for the Production of Enzymes by Solid-State Fermentation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 169, 27–50. https://doi.org/10.1007/10_2019_90
- Muir, B. M. & Anderson, A. R. (2021). Development and Diversification of Sugar Beet in Europe. *Sugar Tech*, 24(4), 992–1009. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01036-9>
- Müller, H., Barthel, L., Schmideder, S., Schütze, T., Meyer, V. & Briesen, H. (2022). From spores to fungal pellets: A new high-throughput image analysis highlights the structural development of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(8), 2182–2195. <https://doi.org/10.1002/bit.28124>
- Niu, J., Alazi, E., Reid, I. D., Arentshorst, M., Punt, P. J., Visser, J., Tsang, A. & Ram, A. F. J. (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.
<https://doi.org/10.1534/genetics.116.194050>
- Niu, J., Arentshorst, M., Seelinger, F., Ram, A. F. J. & Ouedraogo, J. P. (2016). A set of isogenic auxotrophic strains for constructing multiple gene deletion mutants and parasexual crossings in *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*, 198(9), 861–868. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1240-6>
- Ntana, F., Mortensen, U. H., Sarazin, C. & Figge, R. (2020). *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform. *Catalysts*, 10(9), 1064.
<https://doi.org/10.3390/catal10091064>
- Nwinyi, O. C. & Kalu, A. (2021). Sugar Alcohol- Xylitol Production Using *Saccharomyces* Species Isolated From Palm Wine For Sustainable Development

- In Food Industry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 665(1), 12072. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/665/1/012072>
- Oliveira, L. R., Gonçalves, A. R., Quintela, E. D., Colognese, L., Cortes, M. V. d. C. B. & Filippi, M. C. C. de (2024). Genetic Engineering of Filamentous Fungi: Prospects for Obtaining Fourth-Generation Biological Products. *Applied Microbiology*, 4(2), 794–810. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4020055>
- Palmqvist, B., Wiman, M. & Lidén, G. (2011). Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-10>
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Papagianni, M. & Matthey, M. (2006). Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-3>
- Pardey, P. G., Beddow, J. M., Hurley, T. M., Beatty, T. K.M. & Eidman, V. R. (2014). A Bounds Analysis of World Food Futures: Global Agriculture Through to 2050. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 58(4), 571–589. <https://doi.org/10.1111/1467-8489.12072>
- Pel, H. J., Winde, J. H. de, Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., Vries, R. P. de, Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A. E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., . . . Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2), 221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pili, J., Danielli, A., Zeni, J., Trentini, M. M. S., Cansian, R. L., 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. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0011>
- Pirola, R. D. P. B., Baleeiro, F. C. F. & Farinas, C. S. (2013). Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional

- separation steps. *Biotechnology Progress*, 29(6), 1430–1440.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1811>
- Puligundla, P. & Mok, C. (2021). Valorization of sugar beet pulp through biotechnological approaches: recent developments. *Biotechnology Letters*, 43(7), 1253–1263. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03146-6>
- Queiroz, S. S., Jofre, F. M., Mussatto, S. I. & Felipe, M. d. G. A. (2022). Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111789.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111789>
- Rafiqul, I. S. M., Sakinah, A. M. M. & Zularisam, A. W. (2014). Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose reductase from *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*, 37(1), 191–196.
<https://doi.org/10.1007/s10529-014-1672-5>
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R. & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5760), 484–489.
<https://doi.org/10.1126/science.1114736>
- Rao, J., Lv, Z., Chen, G. & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, 140, 101675.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>
- Regmi, P., Knesebeck, M., Boles, E., Weuster-Botz, D. & Oreb, M. (2024). A comparative analysis of NADPH supply strategies in *Saccharomyces cerevisiae*: Production of d-xylitol from d-xylose as a case study. *Metabolic Engineering Communications*, 19, e00245. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2024.e00245>
- Rezić, T., Oros, D., Marković, I., Kracher, D., Ludwig, R. & Santek, B. (2013). Integrated hydrolyzation and fermentation of sugar beet pulp to bioethanol. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(9), 1244–1252.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1210.10013>
- Richter, L., Wanka, F., Boecker, S., Storm, D., Kurt, T., Vural, Ö., Süßmuth, R. & Meyer, V. (2014). Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1, 4.
<https://doi.org/10.1186/s40694-014-0004-9>

- Rouau, X., Bertin, C. & Thibault, J.-F. (1987). Characterization and enzymic degradation of sugar beet fibres. *Food Hydrocolloids*, 1(5-6), 439–443.
[https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(87\)80037-1](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(87)80037-1)
- Roukas, T. & Kotzekidou, P. (2020). Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13105–13113. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07928-9>
- Rüllke, M., Meyer, F., Schmitz, K., Blase, H., Tamayo, E. & Benz, J. P. (2024). A novel luciferase-based reporter tool to monitor the dynamics of carbon catabolite repression in filamentous fungi. *Microbial Biotechnology*, 17(9), e70012.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.70012>
- Rüllke, M., Schönrock, V., Schmitz, K., Oreb, M., Tamayo, E. & Benz, J. P. (2024). Engineering of *Aspergillus niger* for efficient production of D-xylitol from L-arabinose. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02526-7>
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Schäfer, D. S. (2022). *Herstellung von D-Galacturonsäure aus Agrarreststoffen mit Aspergillus niger im Rührkesselreaktor* [Dissertation, Technische Universität München, München]. RIS. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bvb:91-diss-20221021-1661340-1-3>
- Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L. & Benz, J. P. (2019). Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2507–2524.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09622-4>
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. & van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 426–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>
- Semenova, M. V., Rozhkova, A. M., Osipov, D. O., Satrutdinov, A. D., Sinitsyna, O. A., Rubtsova, E. A., Kondrateva, E. G. & Sinitsyn, A. P. (2019). Selection of the Optimal Enzyme Composition for Sugar Beet Pulp Conversion. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(6), 677–683.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050119>

- Silva, I. R., Jers, C., Meyer, A. S. & Mikkelsen, J. D. (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New biotechnology*, 33(1), 41–54.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.07.008>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Son, Y.-E., Yu, J.-H. & Park, H.-S. (2023). The novel spore-specific regulator SscA controls *Aspergillus* conidiogenesis. *mBio*, 14(5), e0184023.
<https://doi.org/10.1128/mbio.01840-23>
- Svanström, Å., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J. & Melin, P. (2014). Trehalose synthesis in *Aspergillus niger*: characterization of six homologous genes, all with conserved orthologs in related species. *BMC microbiology*, 14, 90.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-90>
- Takors, R. & Weuster-Botz, D. (2018). Prozessmodelle. In H. Chmiel, R. Takors & D. Weuster-Botz (Hrsg.), *Bioprozesstechnik* (4. Aufl. 2018, S. 71–105). Springer Berlin Heidelberg.
- Teertstra, W. R., Tegelaar, M., Dijksterhuis, J., Golovina, E. A., Ohm, R. A. & Wösten, H. A. B. (2017). Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 98, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.005>
- Teigiserova, D. A., Bourguine, J. & Thomsen, M. (2021). Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: An overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. *Sustainable Production and Consumption*, 27, 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.02.010>
- Thoresen, M., Malgas, S. & Pletschke, B. I. (2022). Enzyme adsorption-desorption and evaluation of various cellulase recycling strategies for steam pre-treated Eucalyptus enzymatic degradation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(2), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00670-9>
- Toop, T. A., Ward, S., Oldfield, T., Hull, M., Kirby, M. E. & Theodorou, M. K. (2017). AgroCycle – developing a circular economy in agriculture. *Energy Procedia*, 123, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.269>
- Usmani, Z., Sharma, M., Diwan, D., Tripathi, M., Whale, E., Jayakody, L. N., Moreau, B., Thakur, V. K., Tuohy, M. & Gupta, V. K. (2022). Valorization of sugar beet pulp to value-added products: A review. *Bioresource Technology*, 346, 126580.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126580>

- Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Kocsubé, S., O'Gorman, C. M. & Dyer, P. S. (2014). *Aspergillus*: sex and recombination. *Mycopathologia*, 178(5-6), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9795-8>
- Veiter, L., Rajamanickam, V. & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 2997–3006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Velasco-Muñoz, J. F., Aznar-Sánchez, J. A., López-Felices, B. & Román-Sánchez, I. M. (2022). Circular economy in agriculture. An analysis of the state of research based on the life cycle. *Sustainable Production and Consumption*, 34, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.09.017>
- Vishniac, W. & Santer, M. (1957). The thiobacilli. *Bacteriological Reviews*, 21(3), 195–213. <https://doi.org/10.1128/br.21.3.195-213.1957>
- Voragen, A.G.J., Rombouts, F. M., Searle-van Leeuwen, M. F., Schols, H. A. & Pilnik, W. (1987). The degradation of arabinans by endo-arabinanase and arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. *Food Hydrocolloids*, 1(5-6), 423–437. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(87\)80036-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(87)80036-X)
- Wagner, J., Schäfer, D., den Eichen, N. von, Haimerl, C., Harth, S., Oreb, M., Benz, J. P. & Weuster-Botz, D. (2021). D-Galacturonic acid reduction by *S. cerevisiae* for L-galactonate production from extracted sugar beet press pulp hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14-15), 5795–5807. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11433-5>
- Walker, L. P. & Wilson, D. B. (1991). Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. *Bioresource Technology*, 36(1), 3–14. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90095-2)
- Wang, J., Huang, Z., Jiang, Q., Roubík, H., Xu, Q., Gharsallaoui, A., Cai, M., Yang, K. & Sun, P. (2023). Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: The next frontier of food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.020>
- Wang, L., Bilal, M., Tan, C., Jiang, X. & Li, F. (2022). Industrialization progress of lignocellulosic ethanol. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(2), 246–258. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00060-w>
- Wang, Z.-D., Wang, B.-T., Jin, L., Ruan, H.-H. & Jin, F.-J. (2024). Implications of carbon catabolite repression for *Aspergillus*-based cell factories: A review. *Biotechnology journal*, 19(2), e2300551. <https://doi.org/10.1002/biot.202300551>

- Weuster-Botz, D. & Takors, R. (2018). Wachstumskinetik. In H. Chmiel, R. Takors & D. Weuster-Botz (Hrsg.), *Bioprosesstechnik* (4. Aufl. 2018, S. 45–70). Springer Berlin Heidelberg.
- Whitehead, K. A., Liauw, C. M., Lynch, S., El Mohtadi, M., Amin, M., Preuss, A., Deisenroth, T. & Verran, J. (2021). Diverse surface properties reveal that substratum roughness affects fungal spore binding. *iScience*, 24(4), 102333. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102333>
- Witkowski, M., Nemet, I., Li, X. S., Wilcox, J., Ferrell, M., Alamri, H., Gupta, N., Wang, Z., Tang, W. H. W. & Hazen, S. L. (2024). Xylitol is prothrombotic and associated with cardiovascular risk. *European heart journal*, 45(27), 2439–2452. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehae244>
- Wong, D. (2008). Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *The protein journal*, 27(1), 30–42. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9105-0>
- Xu, F., Sun, J., Konda, N. V. S. N. Murthy, Shi, J., Dutta, T., Scown, C. D., Simmons, B. A. & Singh, S. (2016). Transforming biomass conversion with ionic liquids: process intensification and the development of a high-gravity, one-pot process for the production of cellulosic ethanol. *Energy & Environmental Science*, 9(3), 1042–1049. <https://doi.org/10.1039/c5ee02940f>
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C. & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319–338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Zabka, M. & Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.076>
- Zhang, H., Han, L. & Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 140(8), 110758. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>
- Zhang, J., Chu, D., Huang, J., Yu, Z., Dai, G. & Bao, J. (2010). Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(4), 718–728. <https://doi.org/10.1002/bit.22593>

- Zhao, X., Han, L., Ma, X., Sun, X. & Zhao, Z. (2023). Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw to Improve Reducing Sugar Yield by Novel Method under Mild Conditions. *Processes*, 11(3), 898. <https://doi.org/10.3390/pr11030898>
- Ziemiński, K., Romanowska, I., Kowalska-Wentel, M. & Cyran, M. (2014). Effects of hydrothermal pretreatment of sugar beet pulp for methane production. *Bioresource Technology*, 166, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.021>

9. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Abb.	Abbildung
BTM	Biotrockenmasse
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CCR	Kohlenstoff-Katabolitrepression (engl. carbon catabolite repression)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Luftvolumenstrom, L h ⁻¹
g	Gramm
D-GalA	D-Galakturonsäure (engl. D-galacturonic acid)
D-Glu	D-Glukose
h	Stunde (engl. hour)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
L	Liter
LadA	L-Arabitol-Dehydrogenase
LarA	L-Arabinose-Reduktase
LxrA	L-Xylulose-Reduktase
LxrB	L-Xylulose-Reduktase
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mol	Stoffmenge, 1 Mol entspricht $6,02 \times 10^{23}$ Teilchen
n	Rührerdrehzahl, min ⁻¹
N ₂	Stickstoff

Abkürzung	Bezeichnung
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung (lat. <i>pondus hydrogenii</i>)
PGase	Polygalacturonase
pO ₂	Partialdruck von Sauerstoff (Einheit: bar)
PPP	Pentosephosphatweg (engl. Pentose phosphate pathway)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SdhA	Sorbitol-Dehydrogenase
t	Tonnen
T	Temperatur, °C
U	Enzymeinheit (Unit), 1 U entspricht 1,67 x 10 ⁻⁸ kat
V	Volumen, L
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
(v/v)	Volumen zu Volumenanteil
vvm	Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute
(w/v)	Gewichts (engl. weight) - zu Volumenanteil
XdhA	D-Xylitol-Dehydrogenase
XkiA	D-Xylulose-Kinase
XMG	D-Xylose, D-Mannose, D-Galaktose
XyrA	D-Xylose-Reduktase
XyrB	D-Xylose-Reduktase
ZRPS	Zuckerrübenpressschnitzel

10. Anhang

10.1. Verwendete Chemikalien

Tabelle 10.1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
4-Hydroxybenzhydrazid	H9882-25G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aktivkohle	X865.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, 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
Calciumchlorid Dihydrat	5239.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, 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-tetra- essigsäure	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(-)-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
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
Uridin	U3003-50G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylit	W507930	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Zinksulfat-Heptahydrat	1.088.830.500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
------------------------	---------------	---------------------------------------

10.2. Geräte

Tabelle 10.2: Zusammenstellung der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller oder Lieferant
Autoklav	VX 150, V 150	Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
Autoklav	Varioklav EC Zyklondampf	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Analysenwaage	Explorer E1M213, E12145	Ohaus Waagen Vertriebs GmbH, Gießen, Deutschland
Analysenwaage	XA204	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Analysenwaage	SATORIUS ENTRIS6202i- 1S	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubator	WIS-20R	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland
Inkubator	KB 53 E3.1	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator	Bode Mini-Schrank	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	D-6010	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	Variomag	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Magnetrührer	MIX 15 eco	2mag AG, München, 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
Mikrotiterplatten Photometer	MultiscanTM FC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
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
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 Heater	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermoschüttler	Shaker DTS-2	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thermoschüttler	Thermo Shaker TS-100	BioSan SIA, Riga, Litauen
Thermoschüttler	Thermo-Mixer® C	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Vakuum Pumpe	N840.3FT.40.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexer	neoLab 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
Zentrifuge	Rotana 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Tabelle 10.3: Zusammenstellung der Komponenten des Rührkesselreaktors für feststoffhaltige und enzymatische Prozesse im 3,6 L-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktor	Labfors 5	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sauerstoffsonde	VisiFerm DO Arc 225 H0	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pH Sonde	EasyFerm Plus PHI Arc 225	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Abgasanalytik	BlueVary	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Software	eve®	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Tabelle 10.4: Zusammenstellung der Komponenten des Rührkesselreaktors im 7,5 L-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktor	Labfors 5	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sauerstoffsonde	VisiFerm DO Arc 425 H0	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pH Sonde	EasyFerm Plus PHI Arc 425	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Abgasanalytik	BlueVary	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Software	eve®	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Tabelle 10.5: Zusammenstellung der Komponenten der parallelisierten Rührkesselreaktoren im 1,5-Liter-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Rührkesselreaktor	DASGIP® Parallel Bioreactor 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®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Tabelle 10.6: Technische Daten 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)
Software	ChemStation B.04.03

10.3. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10.7: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

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® 0.8 x 70 mm	466 5691	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Acro® 50, BelüftungsfILTER, Emflon® II Membran	A50V002P2	Pall Filtersystems GmbH, Crailsheim, Deutschland
Acro® 50, BelüftungsfILTER, 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	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HPLC-Mikroeinsatz, 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
Millipore Express® PLUS 0.45 µm	HPWP04700	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Minisart®, Spritzenvorsatzfilter	16534	Satorius 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
Petrischale mit Nocken	633180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten Spitzen, 10 mL	702603	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten Spitzen, 10 – 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	0030120086	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tube 2.0 mL	0030120094	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Steritop® PES Membran, 0.22 µm, 45 mm	S2GPT02RE	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TipOne® 1000 µL XL RPT Filterspitze, graduert	S1122-1730	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne® 200 µL UltraPoint Filterspitze, graduert	S1120-8810	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland

TipOne® 20 µL UltraPoint Filterspitze, graduert	S1123-1810	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutsch-land
Ultra-durchsichtige Filme für qPCR	391-1258	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® 150 x 230 mm, steril	1-7158	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

10.4. Datenanhänge

Feststofffermentation von *A. niger* mit gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel in Abschnitt 5.1.



Abbildung 10.1: Umsetzung von gemahlenen Zuckerrübenpressschnitzel mit *A. niger* ATCC 11414 $\Delta gaaX$ im Rührkesselreaktor: Bildaufnahme nach (A) 46 h, (B) 63 h, (C) 72 h und (D) 88 h. Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung wurde die Begasungsrate schrittweise (blau gestrichelte Linien: nach 16 h auf 1 L h^{-1} , nach 42 h auf 3 L h^{-1}) und die Rührerdrehzahl nach 42 h auf 40 min^{-1} erhöht. Die Verflüssigung des feuchten Haufwerks zur Suspension trat nach 42 h auf. ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n_{\text{initial}} = 10 \text{ min}^{-1}$, $F_{\text{Luft, initial}} = 0,2 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 4,5$, $c_{\text{ZRPS}} = 227 \text{ g L}^{-1}$, $2,57 \times 10^6$ Sporen $\text{g}_{\text{ZRPS}}^{-1}$).

Experimente zur Wachstumsinhibierung von *A. niger* in Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat in Abschnitt 6.3.1.

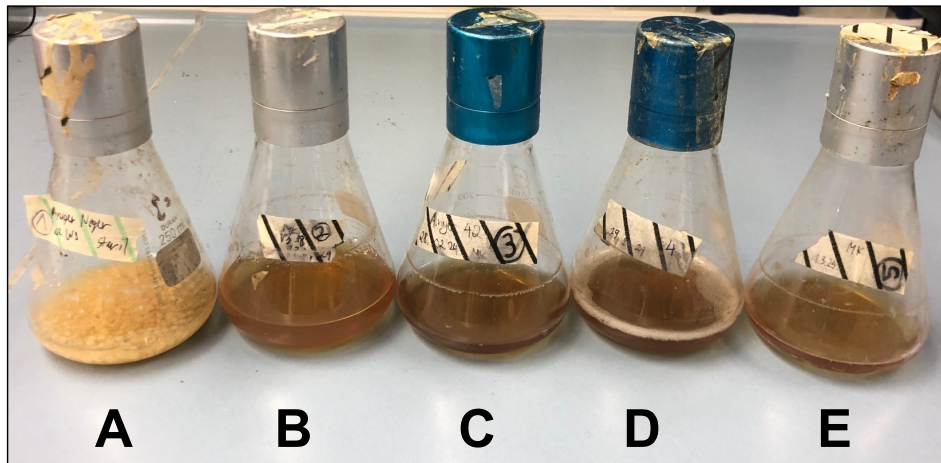


Abbildung 10.2: Wachstum von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ PtdA-FPS1_{open} in Medium mit Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat: Hydrolysatentnahme während enzymatischer Hydrolyse im integrierten Prozess nach (A) 3 h, (B) 27 h, (C) 51 h, (D) 75 h und (E) 99 h. Das Medium wurde mit *A. niger*-Sporen inokuliert und anschließend inkubiert (30 °C, pH₀ = 4,5, 80 min⁻¹). Wachstum fand nur in Schüttelkolben aus der ersten Hydrolysatprobe nach 3 h (A) statt.

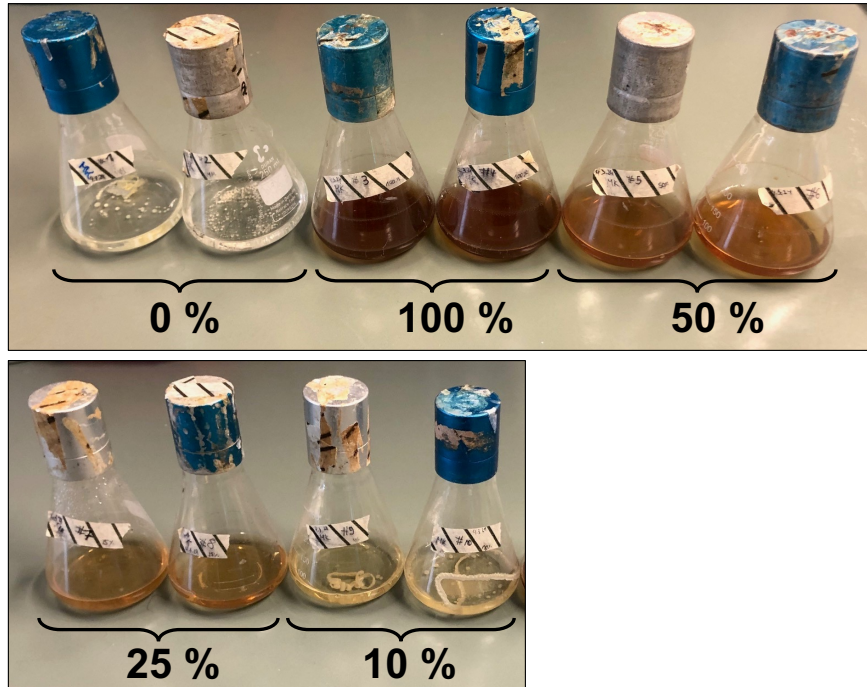


Abbildung 10.3: Studie zur Wachstumsinhibierung von *A. niger* mit unterschiedlichen Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Verdünnungen von 0 %, 100 %, 50 %, 25 % und 10 %. Abbildung nach Inkubation für 168 h bei 30 °C. Wachstum trat nur bei den Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Verdünnungen 25 % und 10 % auf und bei Wachstum mit synthetischem Medium (0 %). (30 °C, pH₀ = 4,5, 80 min⁻¹).

Behandlung des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats mit Aktivkohle in Abschnitt 6.3.1.

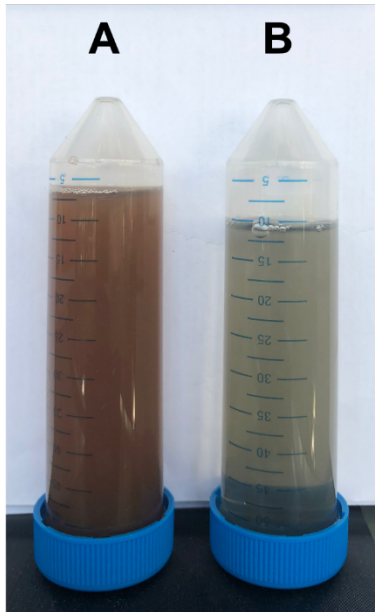


Abbildung 10.4: Farbänderung des Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysats vor (A) und nach (B) der Behandlung mit Aktivkohle.

Makromorphologie von *A. niger* während der Satzprozesse mit synthetischem Medium und Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat Medium in Abschnitt 6.2 und 6.3.2.

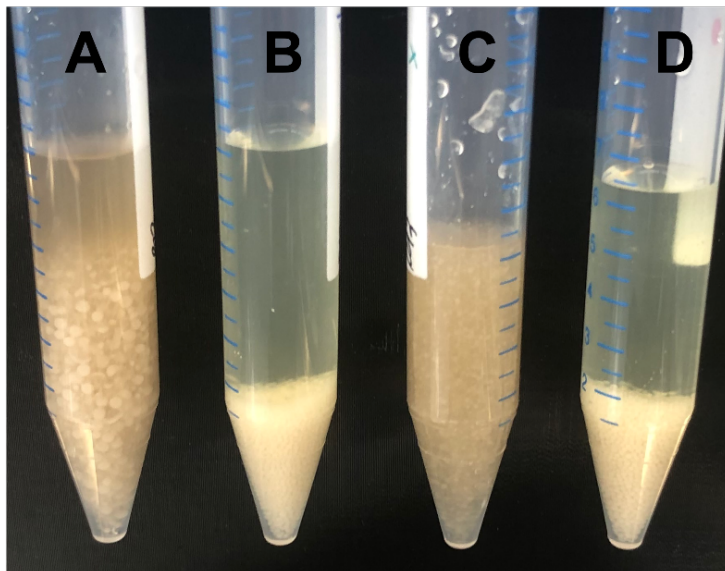


Abbildung 10.5: Morphologie von *A. niger* NRRL3 $\Delta xdhA$, $\Delta sdhA$, $\Delta xkiA$ *P_{tvdA}-FPS1_{open}* bei Satzprozessen zur D-Xylitolproduktion mit (A, C) Zuckerrübenpressschnitzel-Hydrolysat und mit (B,D) synthetischem Medium nach 68 h.