

Zusammenfassung

Mikroorganismen sind in der Lage schnell zu wachsen und können ein breites Spektrum an Biomolekülen synthetisieren, welches je nach Organismus durch genetische Modifizierung angepasst werden kann. Durch Prozessoptimierung können viele von ihnen auf Abfallströmen wachsen und so eine nachhaltige Quelle für eine Vielzahl von Biomolekülen bilden. Aus diesem Grund wurden in der folgenden kumulativen Doktorarbeit zwei Erstveröffentlichungen eingebunden, welche sowohl die Produktion eines hochwertigen Biomoleküls (Vitamin B₉) untersuchen als auch die Basis für Stamm- und Prozessoptimierungen bilden.

Die Grundlage zur Produktion des Vitamin B₉ sind in dieser Arbeit Mikroalgen. Im Allgemeinen sind Vitamine für den Menschen essenzielle Nährstoffe, welche jedoch durch das Prozessieren von Lebensmitteln oft verloren gehen. Daher ist es wichtig, neue, nachhaltige Vitaminquellen zu erschließen, die effizient produziert und für den menschlichen Verzehr genutzt werden können. Zu diesem Zweck wurde eine Auswahl von Süßwasseralgen und Marinen Mikroalgen auf ihre Folatgehalte (Vitamin B₉) hin untersucht. Speziell *Picochlorum sp.* zeigte den bis dato höchsten gemessenen Folatgehalt einer Mikroalge. Zudem wurde erstmals der Einfluss von limitierenden Bedingungen auf den Folatgehalt in der Süßwassermikroalge *C. sorokiniana* mittels eines massenspektrometrischen Stabilisotopen-Verdünnungstests analysiert. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass Mikroalgen als Zusätze zur Steigerung von Vitamingehalten in Lebensmitteln und Kosmetika genutzt werden könnten.

In weiteren Arbeiten zu dieser These wurde die Hydrolasesekretion in der vielversprechenden oleogenen Hefe *C. oleaginosus* untersucht, um so molekulare Einblicke in die breite Substratverwertung dieses Organismus zu erhalten. Die hier gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für weitergehende gentechnische Optimierungen dieser neuen mikrobiellen Lipid-Produktionsplattform. Es wurde bei dieser Untersuchung eine systematische Analyse der Kohlenhydrataufnahme und -verwertung durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf den Einfluss verschiedener Di- und Trisaccharide als einziger Kohlenstoffquelle gelegt. Als Ausgangssubstrate wurden kommerzielle oligomere Kohlenhydrate ausgewählt, die aus Glucose-, Galactose- und Fructosemonomeren bestehen. Diese Substrate dienten in der Folge als Kohlenstoffquelle in *C. oleaginosus*-basierten Fermentationsansätzen. Abschließend wurde eine umfassende Proteomanalyse verschiedener zellulärer Fraktionen durchgeführt, um die Enzymsysteme zu identifizieren, die mit den oligomeren Zuckersubstraten interagieren. Die relative Quantifizierung der spektralen Intensitäten aus nativen Proteomdatensätzen ermöglichte die Identifizierung neuer Enzyme und lieferte neue Erkenntnisse über die Proteinsekretion sowie die molekularen Mechanismen der an der Spaltung der ausgewählten Kohlenstoffoligomere beteiligten Carbohydrolasen. Zusätzlich konnte ein potenzielles Signalmotiv zur Proteinsekretion identifiziert werden.

Abstract

Microorganisms are capable of rapid growth and can synthesize a wide range of biomolecules, which can be adapted through genetic modification depending on the organism. Through process optimization, many of them can grow on waste streams, providing a sustainable source of a wide range of biomolecules. For this reason, two first publications have been included in the following cumulative doctoral thesis, which provides both the production of a high-quality biomolecule (vitamin B₉) and the basis for strain and process optimisation.

The basis for the production of vitamin B₉ in this work is microalgae. In general, vitamins are essential nutrients for humans, but they are often lost through food processing. Therefore, it is important to find new sustainable sources of vitamins that can be efficiently produced and used for human consumption. For this purpose, a selection of freshwater and marine microalgae was investigated for their folate (vitamin B₉) content. *Picochlorum* sp. in particular showed the highest measured folate content of a microalgae to date. In addition, the influence of limiting conditions on the folate content in the freshwater microalga *C. sorokiniana* was analyzed for the first time using mass spectrometric stable isotope dilution tests. The findings obtained here show that microalgae could be used as additives to increase vitamin content in food and cosmetics.

Another point of this work was the investigation of the protein expression of the promising oleogenic yeast *C. oleaginosus*. In order to carry out genetic optimizations, an understanding of the metabolic processes is important. In this work, a systematic analysis of carbohydrate uptake and utilization was carried out by investigating the influence of different di- and trisaccharides as sole carbon sources. Goose oligomeric carbohydrates consisting of glucose, galactose and fructose monomers were selected. *C. oleaginosus* was cultured in the selected disaccharides and extensive proteomic analysis of different cellular fractions was performed to identify the enzyme systems interacting with the oligomeric sugar substrates. Relative quantification of spectral intensities from raw proteomic datasets enabled the identification of new enzymes and provided new insights into protein secretion as well as the molecular mechanisms of the carbohydrases involved in the cleavage of the selected carbon oligomers. In addition, a potential signalling motif for protein secretion was identified.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Brück bedanken, der mir die Promotion am Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie ermöglicht hat. In dieser großartigen Zeit hatte er stets ein offenes Ohr und half mir mit seiner Expertise und Erfahrung bei wissenschaftlichen Fragen stets weiter. Durch sein Vertrauen konnte ich mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich weiterentwickeln. Vielen Dank für alles, Thomas!

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Michael Rychlik, Prof. Dr. Mario Jekle und Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich für die Prüfung und Bewertung meiner Dissertation.

Mein Dank gilt außerdem meinen Betreuern Dr. Monika Fuchs und Dr. Mahmoud Masri, die mich in der Bearbeitung meines Industrieprojektes unterstützten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Dr. Norbert Mehlmer danke ich besonders für die vielen Ideen und die Hilfestellung während der Promotionszeit. Zu dir konnte ich jederzeit kommen!

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die herausragende Zeit und den einmaligen Teamgeist danken. Ich habe hier viele neue Freundschaften geschlossen und werde den täglichen Kontakt zu euch sehr vermissen. Ein spezieller Dank geht an Dirk Woortman für die gute Zusammenarbeit und die vielen Cocktailabende in Freising sowie an Pariya Shaigani, mit der ich mein Projekt CO₂ Lubricants bearbeiten durfte.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern sowie meiner weiteren Familie für die bedingungslose Unterstützung danken. Ihr wart immer für mich da und euer Vertrauen hat mir die Kraft gegeben, meinen Weg bis hierher zu gehen. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Schließlich danke ich meiner Freundin Adina für ihre umfassende Unterstützung in allen Höhen und Tiefen. Die Geduld, die du bei unzähligen Gesprächen aufgebracht hast, besonders wenn Experimente mal nicht positiv verliefen, war einmalig! Dein Vertrauen bedeutet mir mehr, als dir du dir vorstellen kannst.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Danksagung	III
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Mikrobielle Basischemikalien	1
1.1.1 Triglyceride	2
1.1.2 Vitamine	3
1.1.3 Sekundärmetabolite	5
1.2 Projekt: CO ₂ -Lubricants	5
1.3 Mikrobielle Produktion von Hochwertstoffen und deren Optimierung	7
1.3.1 Mikroalgen	7
1.3.2 Hefen	10
1.3.3 Einfluss von Umweltbedingungen auf die Wertstoffproduktion durch Mikroorganismen	12
1.3.4 Genetische Optimierung	14
2 Methoden	15
2.1 Kultivierung der Mikroorganismen	15
2.2 Fettsäureanalyse	17
2.3 Proteinextraktion	18
2.4 Proteinaufreinigung für LC MS/MS Analyse	19
2.5 Bioinformatische Auswertung	20
3 Publikationen	21
3.1 Zusammenfassung der eingebundenen Publikationen	21
Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay	21
Identifying carbohydrate-active enzymes of <i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i> using systems biology	22
3.2 Publikationen in voller Länge	23
Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay	23
Identifying carbohydrate-active enzymes of <i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i> using systems biology	24
4 Diskussion	25
4.1 Nachhaltige Produktion von mikrobiellen Hochwertstoffen	25
4.2 Mikroalgen basierte Wertstoffe	25

4.3	Grundlagenerforschung eines Hefemetabolismus zur späteren Prozessoptimierung	28
5	Ausblick	31
6	Liste der Publikationen	32
7	Reprint Permission	34
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	36
9	Literaturverzeichnis	37

Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxide
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
EC	Enzymklasse
H	Stunde
g	Gramm
GC	Gaschromotographie
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nonameter
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
T	Temperatur
TAG	Triacylglycerole
U	atomare Masseneinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Mikrobielle Basis-Chemikalien

Mikroorganismen spielen in der heutigen Zeit eine wichtige Rolle bei der Herstellung von nachhaltigen Produkten. So werden sie in der Lebensmittelindustrie, dem pharmakologischen und biotechnologischen Sektor oder zur Produktion von Biokraftstoffen der 2. Generation verwendet, wie der Prozess Sunliquid von der Firma Clariant zeigt.¹ Hierbei zählt vor allem das schnelle Wachstum gepaart mit der großen Variation an potenziell nutzbaren Metaboliten zu den Hauptvorteilen. Zu ihnen gehören verschiedenste Stoffe wie Ethanol, Triglyceride, Vitamine und Sekundärmetabolite (Pigmente, Antibiotika und Terpene), welche für industrielle Anwendungen relevant sind (Abbildung 1).^{2,3,4} Durch Entwicklung von Prozessen wie der Herstellung von Bioethanol durch *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) aus Lignocellulose oder der Produktion von Astaxanthin mithilfe von *Haematococcus pluvialis* können diese Produkte nachhaltig gewonnen und aufgereinigt werden, um im Anschluss, wie in Abbildung 1 dargestellt, zur Weiterverarbeitung genutzt zu werden.^{3,5,6} Ein Beispiel für die hierbei gewonnenen Basisstoffe sind zum einen Lipide, welche häufig in Lebensmitteln Verwendung finden, oder auch Bioethanol, aus dem umweltschonender Treibstoff gewonnen wird.^{7,8} Außerdem werden aus den extrahierten Proteinen Futterzusätze und aus Kohlenhydraten bioaktive Stoffe gewonnen.⁹ Der aus diesem Prozess resultierende Abfallstrom kann in Biogasanlagen zur Gewinnung von Strom und Wärme verwendet werden.

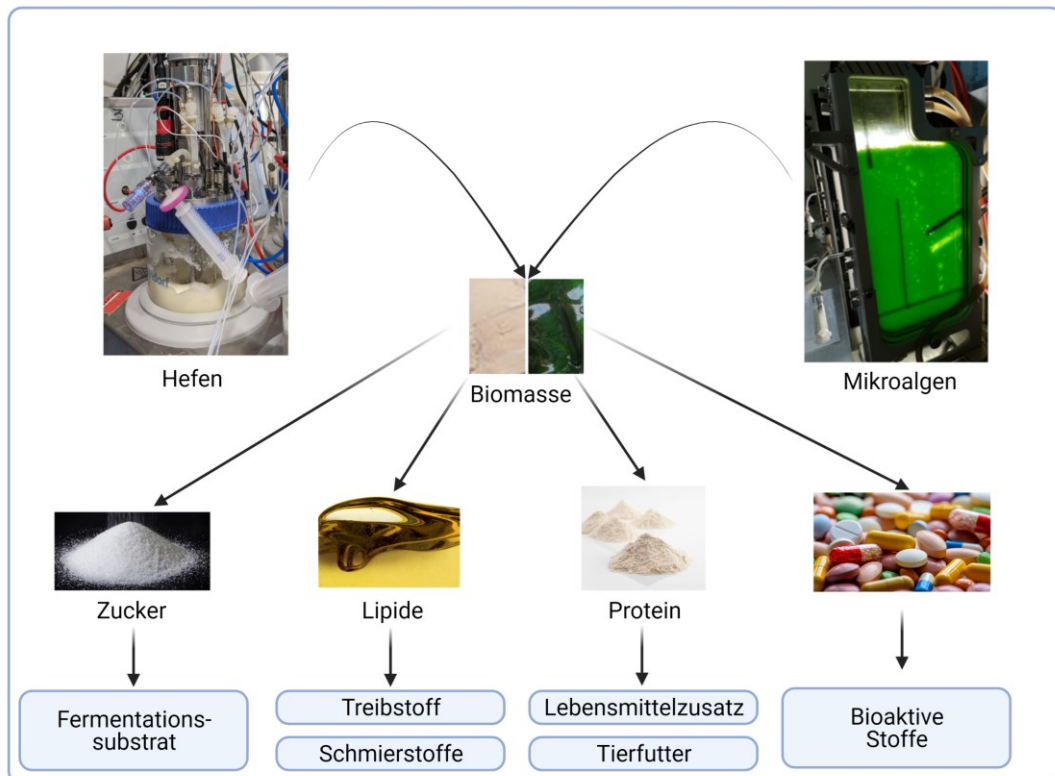


Abbildung 1: Schemata der Gewinnung von Hochwertstoffen aus Mikroorganismen

1.1.1 Triglyceride

Triglyceride gehören zur Gruppe der Neutralfette. Sie bestehen, wie Abbildung 2 zeigt, aus einem Glycerinrückrad, welches über drei Esterverbindungen mit je einer Fettsäure (Tabelle 1) verbunden ist.

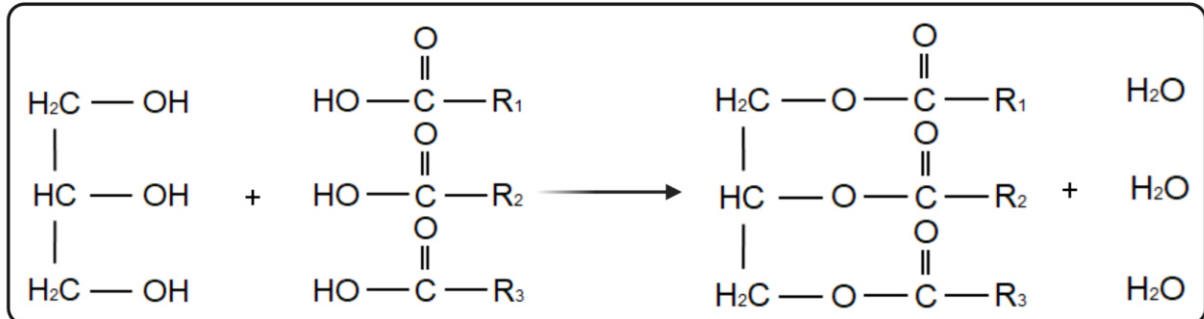


Abbildung 2: Aufbau eines Tryglycerides

Tabelle 1: Auflistung ausgewählter Fettsäuren, die in Mikroorganismen vorkommen

Zahl der C-Atome: Doppelbindungen	Trivialname	Bruttoformel
C14:0	Myristinsäure	C ₁₃ H ₂₇ COOH
C14:1	Myristoleinsäure	C ₁₃ H ₂₅ COOH
C16:0	Palmitinsäure	C ₁₅ H ₃₁ COOH
C16:1	Palmittoleinsäure	C ₁₅ H ₂₉ COOH
C18:0	Stearinsäure	C ₁₇ H ₃₅ COOH
C18:1	Ölsäure	C ₁₇ H ₃₃ COOH
C18:2	Linolsäure	C ₁₇ H ₃₁ COOH
C18:3	Alpha-Linolensäure	C ₁₇ H ₂₉ COOH
C20:0	Arachinsäure	C ₁₉ H ₃₉ COOH
C20:1	Gadoleinsäure	C ₁₉ H ₃₇ COOH
C20:4	Arachidonsäure	C ₁₉ H ₃₁ COOH
C20:5	Eicosapentaensäure	C ₁₉ H ₂₉ COOH
C22:0	Behensäure	C ₂₁ H ₄₃ COOH
C22:1	Cetoleinsäure	C ₂₁ H ₄₁ COOH
C22:6	Docosahexaensäure	C ₂₁ H ₃₁ COOH
C24:0	Lignocerinsäure	C ₂₃ H ₄₇ COOH
C24:1	Nervensäure	C ₂₃ H ₄₅ COOH

Aktuell werden die meisten der für die Chemie-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie benötigten Lipide auf Basis von pflanzlichen und tierischen Ausgangsstoffen hergestellt. In diesem

Zusammenhang sorgt vor allem die stetig wachsende Nachfrage nach Lipiden für Non-Food-Zwecke für viele Diskussionen.¹⁰ So werden in der Europäischen Union aktuell ca. 14.000.000t dieser Fette für die Produktion von Biodiesel genutzt.¹¹ Zusätzlich belasten weitere Bereiche wie die Produktion von pharmazeutisch aktiven Lipiden aus Fischen und Krabben unsere Ökosysteme. Diese Problematik könnte durch die Nutzung von Mikroorganismen zur Gewinnung von Lipiden teilweise gelöst werden, da hierfür Reststoffströme genutzt werden können und die Lipidausbeute pro Hektar, verglichen zu herkömmlichen Quellen, wesentlich höher ist.¹² Das Fettsäureprofil von natürlichen Triglyceriden variiert abhängig vom jeweiligen Mikroorganismus sowie der Änderung der physiologischen Unterschiede.^{13,14} Dies ermöglicht eine gezielte Organismenselektion, um das Triglyceridprofil auf den jeweiligen Prozess abzustimmen. Ein Beispiel für die Nutzung von Mikroorganismen zur Herstellung von Lipiden ist die Verwendung von oleogenen Hefen wie *Lipomyces doorenjongii* und *Cutaneotrichosporon oleaginosus* (*C. oleaginosus*), die über 70% w/w an Triglyceriden bilden können.^{2,15} Außerdem gibt es Mikroalgen, welche in der Lage sind, mithilfe von Licht und CO₂ über 50% w/w an Triglyceriden ihrer gesamten Biotrockenmasse zu akkumulieren. Diese photoautotrophen Mikroorganismen können bis zu 10 mal schneller wachsen als terrestrische Pflanzen.¹²

1.1.2 Vitamine

Vitamine sind essenziell für die Funktion des Energiestoffwechsels sowie für die damit verbundene Zellvitalität und müssen, da sie vom Körper nicht bzw. nicht im ausreichenden Maße synthetisiert werden können, über die Nahrung aufgenommen werden.^{16,17} Zusätzlich fungieren Vitamine im menschlichen Körper als Cofaktoren und werden, wie Abbildung 3 zeigt, in die fettlöslichen und wasserlöslichen Vitamine untergliedert.¹⁷

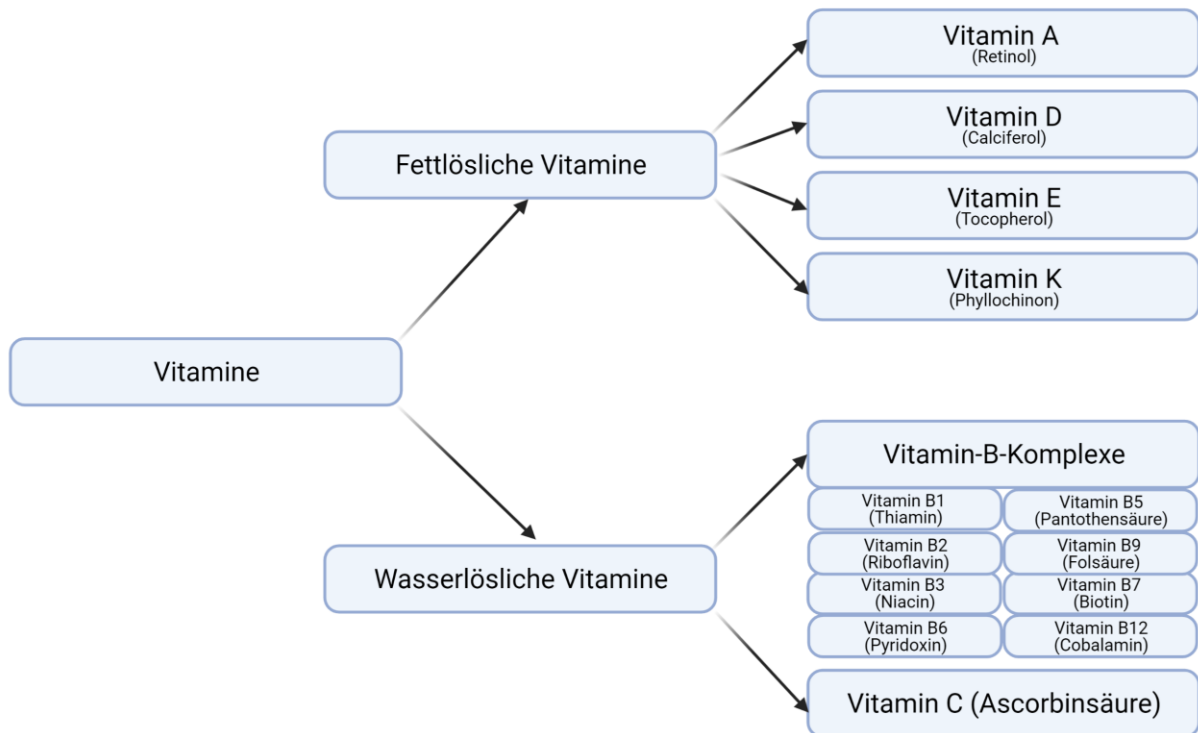


Abbildung 3: Aufteilung der Vitamine

Es wird gezeigt, dass Vitamine sich in fettlösliche und wasserlösliche Vitamine aufteilen lassen. Zusätzlich werden Beispiele für jede der zwei Gruppen genannt.

Die Nachfrage nach Vitaminen steigt aufgrund von Mangelernährung, verursacht durch prozessierte Lebensmittel (z.B. wie Weißbrot) oder die Art der Zubereitung (Erhitzen tötet Vitamine ab), weiter an.¹⁷ Um diesem Mangel vorzubeugen, müssen Vitamine extern zugeführt werden.¹⁷ Hierzu werden meistens vollsynthetisierte Präparate eingesetzt, deren Biorespiration jedoch limitiert ist. Ein Beispiel für die gestiegene Nachfrage ist der Absatz von Vitamin B₁₂ in Deutschland, welcher im Jahr 2018 verglichen zum Vorjahr um 11,9% gestiegen ist.¹⁸ Um diesen Bedarf auch in Zukunft zu decken und die Produktion gleichzeitig im Vergleich zur chemischen Synthese von Vitaminen nachhaltiger zu gestalten, müssen neue Ressourcen zur Vitamingewinnung gefunden werden.¹⁹ Mikroorganismen werden hierbei oft als Alternative genannt, da sie in der Lage sind, ein breites Spektrum an verschiedensten Vitaminen zu synthetisieren.²⁰ So werden heute schon Milchsäurebakterien für die Produktion von Vitaminen der B-Gruppe verwendet.¹⁹ Zusätzlich beschäftigen sich aktuelle Forschungsprojekte mit der Frage, ob Mikroorganismen sich für die Produktion von Vitamin B₆ eignen.^{21,22} Zudem wird nach Produktionsstämmen für Vitamin C geforscht.²³

1.1.3 Sekundärmetabolite

Substanzen wie Aminosäuren und Proteine sind in Organismen direkt am Energiestoffwechsel beteiligt. Daher gehören diese Stoffe zu den primären Metaboliten und werden überwiegend in der Trophophase gebildet. Alle weiteren Metabolite, welche nicht in direktem Zusammenhang zum zellulären Erhaltungsstoffwechsel stehen, werden dem sogenannten sekundären Stoffwechsel zugeordnet.^{24,25} Hierbei gibt es einige sekundärmetabolitische Substanzen, die noch keiner biologischen Funktion zugeordnet werden konnten, andere wiederum besitzen unterschiedliche Funktionen und wurden unter anderem als Lockstoffe (Hormone) oder als Stoffe zur Abwehr von Fressfeinden identifiziert.²⁶ Zu den bekanntesten sekundären Metaboliten gehören Terpene, Phenole und Alkaloide, die teilweise in Prozessen verwendet werden.²⁴ So werden Pigmente wie Astaxanthin zur Fleischfärbung von Lachsen dem Futtermittel zugemischt oder Terpene wie Cembratrienol (CBT-ol) als Pflanzschutzmittel genutzt.^{27,28} Genau diese wertvollen Metabolite werden im Stoffwechselprozess von Mikroorganismen synthetisiert und so könnten diese eine ökologisch nachhaltige Basis zur Herstellung von Produkten wie Astaxanthin oder Ketoliden sein.^{29,30}

1.2 Projekt: CO₂-Lubricants

Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Projekt CO₂-Lubricants bietet einen möglichen Ansatz zur Weiterentwicklung der zuvor beschriebenen Gewinnung hochwertiger Stoffe. Zur Bearbeitung wurde eine Gruppe aus mittleren und großen Industriepartnern (Audi, Klüber Lubrication, Subitec GmbH) sowie einem wissenschaftlichen Partner (TU München) gebildet. Das Projekt hatte zum Ziel, aus CO₂-Reststoffströmen mithilfe von Mikroorganismen (Algen und Hefen) in einem zweistufigen Prozess verwertbare Öle zu gewinnen (s. Abbildung 4). Diese wiederum sollten nach ihrer Extraktion aus den Mikroorganismen zu biobasierten Schmierstoffen weiterverarbeitet werden, welche in Zukunft weniger nachhaltige Schmiermittel ersetzen sollen.

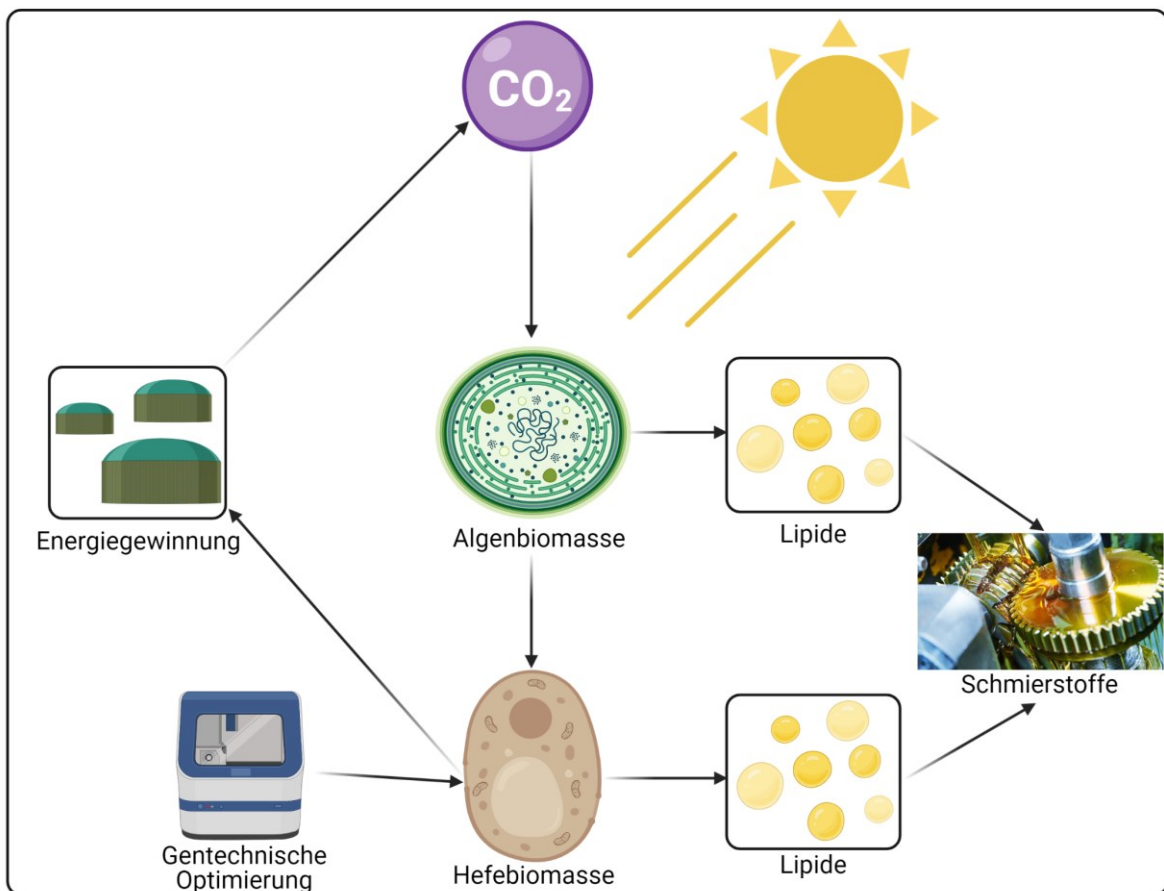


Abbildung 4: Schematische Darstellung des CO₂-Lubricants-Projektes

Zu Beginn des Projektes sollten drei Mikroalgenstämme identifiziert werden, mit deren Hilfe ein effizienter Prozess entwickelt werden könnte. Hierfür mussten die entsprechenden Algen neben einem schnellen Wachstum auch eine hohe Lipidanreicherung sowie hohe Biomassekonzentrationen erzielen. Zur Algenidentifikation wurde ein breit angelegtes Screening mit halophilen Mikroalgen, welche aus der ganzen Welt stammten (z.B. Australien und Mexiko), angelegt. Diese halophilen Mikroalgen sind in der Lage, erhöhte Salzkonzentrationen zu tolerieren, was wiederum zu einem geringeren Kontaminationsrisiko und einer damit verbundenen höheren Prozessstabilität führt. Zusätzlich kann durch CO₂-Konversion Kohlenstoffdioxid in Wertstoffe umgewandelt werden. Die Kultivierungsbedingungen der vielversprechendsten Algen wurden in einem weiteren Schritt speziell auf Biomasse und Fettgehalt hin optimiert. Hierbei wurden verschiedene Stressfaktoren wie Nitrat- und Phosphatlimitierungen eingesetzt, da diese, wie häufig in der Literatur beschrieben, zu einer Akkumulation von Lipiden bei Mikroorganismen führen.^{31,32} Die hieraus gewonnenen Daten und Parameter wurden verwendet, um die Produktion der Algenbiomasse auf einen industriellen Maßstab hochzuskalieren.

Anschließend wurde die aus diesem industriellen Prozess gewonnene Biomasse gewaschen, um so die aus der Kultivierung verbliebenen Salze zu entfernen. Diese hätten bei der folgenden Hydrolyse der Algenbiomasse einen negativen Effekt auf die Aktivität der eingesetzten Enzyme und könnten diese sogar denaturieren. Ziel der Hydrolyse war es, die Zellwände der Mikroalgen, welche aus verschiedenen Heteropolysacchariden (Beispiel Monomere der Polysaccharide: Xylose, Glukose, Galaktose oder Mannose) bestehen, in monomere Zucker zu hydrolisieren.³³ Dies war wichtig, da die oleogenen Hefen, welche im späteren Verlauf das Algenhydrolysat als Kohlenstoffquelle nutzen sollten, monomere Kohlenhydrate effizienter verstoffwechseln können. Ein weiterer positiver Nebeneffekt ist die Freisetzung der Lipide in das Medium, was deren Abtrennung vor der weiteren Verarbeitung in Schmierstoffe erleichtert. Um den Prozess der Algenhydrolyse hinsichtlich Wirksamkeit und Kosteneffizienz zu optimieren, wurden verschiedene Enzymgemische aus kommerziell erhältlichen Enzymen getestet und das vielversprechendste Gemisch für den weiteren Prozess herangezogen. Nach Abtrennung der Lipide wurde die gewonnene Zuckerlösung zur Kultivierung der oleogenen Hefe *C. oleaginosus* verwendet.

Um das Wachstumsverhalten von *C. oleaginosus* auf Hydrolysaten zu analysieren, wurden zunächst verschiedene Modellhydrolysate getestet. Ziel sollte, neben einem schnellen Wachstum, das Erreichen einer Lipidausbeute von über 50% w/w sein. Aus diesem Grund wurden, wie bei der Algenkultivierung, verschiedene Stressfaktoren sowie unterschiedliche Nährstoffquellen getestet. Außerdem sollte durch genetische Optimierung ein höherer Fettgehalt in der finalen Hefebiomasse erzielt werden. Die durch die Mikroalgen- und Hefekultivierung gewonnenen Fette wurden im Anschluss auf ihre Eigenschaften zur Schmierstoffherstellung hin untersucht. Des Weiteren wurde ein Schmierstoff hergestellt und mit etablierten Stoffen verglichen. Dieser wurde schließlich auf die Verwendung in Automobilen getestet.

1.3 Mikrobielle Produktion von Hochwertstoffen und deren Optimierung

Der folgende Abschnitt gibt einen Einblick in die Produktion von Hochwertstoffen durch Mikroorganismen.

1.3.1 Mikroalgen

Mikroalgen sind einzellige Mikroorganismen, welche zur Domäne der Eukaryoten zählen und zu den frühesten Formen des Lebens gehören. Nach außen besitzen sie eine Zellwand sowie verschiedene subzelluläre Kompartimente, welche durch Membranen räumlich abgetrennt sind und Organellen bilden. Beispiele von Zellorganellen sind die Chloroplasten. Diese sind

nach der Endosymbiontentheorie durch eine mehrstufige Symbiose einer eukaryotischen Zelle (Euzyte) mit einem Cyanobakterium entstanden und ermöglichen es den Mikroalgen, Photosynthese zu betreiben.³⁴ Dadurch sind Mikroalgen in der Lage, mittels Sonnenlicht und dem Kohlenstoffdioxidgas höhere Kohlenstoffverbindungen aufzubauen. Zusätzlich bildet deren Metabolismus weitere potenzielle Wertstoffe wie Proteine, Triglyceride, Vitamine und Pigmente.^{35,36}

Diese nachhaltige Produktion eines breiten Spektrums an Substanzen führt dazu, dass das Interesse an deren Gewinnung aus Mikroalgen und der Entwicklung der dafür notwendigen Produktionsprozesse in den letzten Jahren stetig gewachsen ist.^{37,35,38,36} Ein weiterer Beleg für das wachsende Interesse ist der im Zeitraum zwischen 2018 und 2020 um 8,57% gestiegene Marktwert der durch Algen gewonnenen Produkte wie Pigmente, Proteine und PUFAS.³⁹ Zusätzlich zeigen Prognosen eine voraussichtliche Zunahme um weitere 22,8% auf 3.451.000 US-Dollar bis zum Jahr 2025.³⁹

Zu den Hauptverwendungen zählt die Produktion von Biomasse und Lipiden, welche unter anderem zur Gewinnung von Biokraftstoffen für die Automobilität genutzt werden, sowie die Produktion von Vitaminen und Pigmenten für die Herstellung von Lebensmitteln oder zur pharmazeutischen Anwendung.^{40,9} Diese große Vielfalt an Produkten, gepaart mit dem daraus folgenden wirtschaftlichen Interesse, führt zu einer Intensivierung in der Mikroalgenforschung. Aus diesem Grund rücken Forschungs- und Entwicklungsfelder wie z.B. die Gewinnung von Vitaminen und Sekundärmetaboliten durch Mikroalgen immer mehr in den Vordergrund.⁴¹ Hierbei wird versucht, durch Screening von neuen und etablierten Algenstämmen weitere Produkte zu generieren. So wurde gezeigt, dass Mikroalgen wie z.B. *Nannochloropsis oculata* und *Trentepohlia aurea* (Tabelle 2) Vitamine der Klasse E und C anreichern und so für deren Produktion genutzt werden können.^{42,43} Ein weiteres Beispiel ist die Nutzung der Mikroalge *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), welche große Mengen Astaxanthin bilden kann, das bei der kommerziellen Zucht von Lachs oder Lachsforellen eingesetzt wird.⁴⁴ Hierbei wird die Mikroalge direkt als Zusatz dem Fischfutter beigemischt und sorgt dafür, dass das von Natur aus weiße Fleisch der Kulturfische seine für die Verbraucher attraktive rote Färbung erhält.⁴⁵

Tabelle 2: Übersicht von Mikroalgen und deren gebildeten Produkten

Es werden verschiedene industrierelevante sowie potenziell in Zukunft wichtige Mikroalgenstämme und die daraus zu gewinnenden Produkte sowie deren Nutzen für die Industrie aufgelistet. Industrierelevante Stämme sind mit ¹, die für zukünftige Produktionen wichtigen mit ² gekennzeichnet.

Mikro-organismus	Produkt	Nutzen
<i>Dunaliella salina</i>¹	Carotinoide, β-Carotin	Gesundheitsnahrung, Nahrungsergänzungsmittel, Futtermittel ⁴⁶
<i>Chlorella vulgaris</i>¹	Biomasse	Gesundheitsnahrung, Nahrungsergänzungsmittel ⁴⁴
<i>Haematococcus pluvialis</i>¹	Carotinoide, Astaxanthin	Gesundheitsnahrung, Pharmazeutika, Futtermittelzusatzstoffe ⁴⁴
<i>Spirulina platensis</i>¹	Phycocyanin, Biomasse	Phycocyanin, Biomasse ⁴⁴
<i>Isochrysis galbana</i>²	Fettsäuren	Tiernahrung ⁴⁴
<i>Trentepohlia aurea</i>²	Vitamin E und C	Lebensmittel ⁴³
<i>Lyngbya majuscula</i>²	Immunmodulatoren	Pharmazeutika, Ernährung ⁴⁷
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>²	Wasserstoff	Biokraftstoff ⁴⁸
<i>Nannochloropsis oculata</i>²	Vitamin E	Lebensmittel ⁴⁹

Auch Wirkstoffe wie Fucoxanthin, extrahiert aus der Alge *Phaeodactylum tricornutum*, oder Immunmodulatoren werden aktuell aus Mikroalgen gewonnen.⁵⁰ Diese Erweiterung der Produktpalette soll helfen, den derzeit größten Nachteil der auf Algen basierenden Prozesse, die kostenintensive Kultivierung und Aufreinigung, zu minimieren.⁴¹ Eine Möglichkeit wäre, die Prozessführungen durch eine Gewinnung von verschiedenen Koppelprodukten rentabler zu gestalten. Als Beispiel könnten Stoffe wie Lipide und Astaxanthin in einem gemeinsamen Prozess erzeugt werden, was wiederum zu höheren Erlösen führen würde. Ein weiterer Faktor zur Senkung der Kosten könnte die Bildungsoptimierung und die damit verbundene höhere Ausbeute der jeweiligen Produkte durch den verwendeten Organismus sein.⁵¹ Hierbei wird vor allem auf den Einsatz von Stressoren gesetzt, die gewünschte metabolische Zustände bewirken, welche zu höheren Erträgen führen können.⁵¹ Ein bekanntes Beispiel ist die Nutzung von Nitrat- oder Phosphatlimitierung zur Steigerung des Lipidgehaltes in Mikroalgen.⁵² Hierbei

wird sich zunutze gemacht, dass viele Mikroalgen unter Entzug von Nitrat oder Phosphat ihren Stoffwechsel umstellen und Speicherlipide anreichern.⁵¹

1.3.2 Hefen

Hefen sind vorwiegend einzellige Pilze, die ebenfalls zur Domäne der Eukaryoten zählen und deshalb kompartimentiert sind und Zellorganellen besitzen. Die für die Vermehrung benötigte Energie kommt aus der Metabolisierung von Kohlenstoffquellen. Eine Besonderheit von Hefen ist, dass eine Vielzahl von Arten in der Lage ist, fakultativ anaerob zu wachsen. Hierdurch können sie in Abwesenheit von Sauerstoff niedermolekulare Kohlenstoffverbindungen wie Ethanol bilden. Zusätzlich bilden sie verschiedenste Substanzen, welche, wie Tabelle 3 zeigt, schon heute durch industrielle Prozesse in Hochwertstoffe umgewandelt werden können. So werden Hefen wie *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) und *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) schon heute zur Produktion von Lebensmitteln wie Kefir und Käse genutzt.⁵³ Andere Stämme können zur Produktion von Ethanol und Isopropanol kultiviert werden.^{53,54}

Tabelle 3: Übersicht von Mikroalgen und deren gebildeten Produkten

Es werden verschiedene Hefestämme sowie die aus diesen zu gewinnenden Produkte und deren Nutzen für die Industrie aufgelistet.

Mikroorganismus	Produkt	Nutzen
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kefir	Laktosefermentation in Kefir und Kefirkörnern ⁵³
<i>Geotrichum candidum</i>	Cremona Käse	Käseproduktion ⁵³
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol, organische Säuren, Enzyme	Lebensmittelproduktion, Pharmazie ⁵³
<i>Candida utilis</i>	Isopropanol ⁵⁴	Chemie Industrie
<i>Komagataella phaffii</i>	Lycopene	Antitumorwirkung ⁵⁵
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Limonene	Geschmacksstoff ⁵⁶
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xanthan ⁵⁷	Verdickungsmittel/ Exopolysaccharid

Dennoch wird stetig daran geforscht, neue Produkte und verbesserte Prozesse zu entwickeln. Hierbei spielen speziell Lipide eine Rolle, da aus ihnen Produkte wie Polymere, Nutrazeutika, Chemikalien oder Treibstoffe gewonnen werden können.⁵⁸ Damit verbunden rückt die Klasse der oleogenen Hefen in den letzten Jahren in den Fokus. Diese Mikroorganismen sind in der

Lage, einen hohen Anteil ihrer Zellbiomasse in Form von Lipiden zu akkumulieren.⁵⁹ Hierdurch können Prozesse kostensparender betrieben werden. Einer dieser Vertreter ist die oleogene Hefe *C. oleaginosus*. Diese ist unter nicht nährstofflimitierten, optimalen Wachstumsbedingungen unter hoher Zugabe von Sauerstoff in der Lage, mehr als 20% w/w ihrer Zellbiomasse an Lipiden zu akkumulieren.⁶⁰ Durch weitere Anpassung der Prozessparameter kann die Lipidbildung auf bis zu 87% w/w gesteigert werden.¹⁵ Um die Produktivität dieser oleogenen Mikroorganismen weiter zu steigern, ist ein Verständnis der Zellbiologie elementar. Hierzu zählen unter anderem die Verwertung neuer Substratquellen, die Bildung spezifischer Transporter der jeweiligen Kohlenstoffquelle sowie allgemeine metabolische Reaktionen. Am Beispiel des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wird sichtbar, dass durch ein genaueres Verständnis der Zellbiologie stammspezifische Optimierungen wie Nährstoffnutzung oder Informationen zur gentechnischen Optimierung gewonnen werden können.⁶¹ Diese Informationen wiederum wurden in zahlreichen Untersuchungen genutzt, um die Produktivität von Prozessen dieser Hefe zu verbessern. So konnten mittels chemischer Mutagenese neue *S. cerevisiae*-Stämme generiert werden, welche unter Anwesenheit von Ethanol höhere Wachstumsraten sowie eine gesteigerte Überlebensfähigkeit in letalen Ethanolkonzentrationen aufwiesen.⁶² Des Weiteren wurde die Hefe durch eine Metabolic-Engineering-Strategie zur Bildung von Milchsäure verwendet.⁶³

Allerdings fehlt diese breite Datenlage in der aktuellen Literatur für Stämme wie *C. oleaginosus*, was eine effiziente Entwicklung von auf ihr basierenden Prozessen verhindert. Aus diesem Grund muss die Zellbiologie der oleogenen Hefe *C. oleaginosus* näher und detaillierter analysiert werden. Die aus einer solchen Untersuchung gewonnenen Daten können im Anschluss zur Verbesserung der aktuellen Prozesse dienen. Außerdem können mithilfe genetischer Optimierungen neue Produktfelder erschlossen werden.

1.3.3 Einfluss von Umweltbedingungen auf die Wertstoffproduktion durch Mikroorganismen

Die von Mikroorganismen produzierten Wertstoffe bzw., wie im Fall von Lipiden, deren Zusammensetzung können durch Veränderung der jeweiligen Prozesseinstellungen variiert werden. Hierzu zählen, wie zuvor schon erwähnt, die Auswahl eines geeigneten Mikroorganismus, die Variation der physikalischen (Rührer, Druck und Temperatur) und chemischen (Medienzusammensetzung, pH-Wert) Eigenschaften sowie deren Optimierung für den jeweiligen Prozess.⁶⁴ Durch Anpassung bzw. Veränderung dieser Parameter kann eine Steigerung der Produktionsmenge erreicht werden.⁶⁴ Die folgenden Punkte geben einen Überblick über die unterschiedlichen Einflussmöglichkeiten sowie deren Auswirkungen auf die jeweilige Produktivität der Mikroorganismen.

Nährstoffoptimierung und -limitierung

Zu den Grundnährstoffen, welche Mikroorganismen an ein Kultivierungsmedium stellen, zählen die sogenannten Makronährstoffe wie Kohlenstoff-, Phosphor- und Stickstoffverbindungen, welche die Basis von Kultivierungsmedien für Mikroorganismen bilden.⁶⁵ Zum Beispiel kann durch eine geeignete Wahl der Kohlenstoffquelle das mikrobielle Wachstum beeinflusst werden. So führen monomere Zucker wie Glukose, welche schneller für den Stoffwechsel zur Verfügung stehen als langkettige Polymere (Cellulose), zu einem gesteigerten Wachstum. Ein weiterer wichtiger Teil jedes Mediums sind Mikronährstoffe wie Eisen, Kalium oder Magnesium.⁶⁵ Sie werden nur in Spuren benötigt, besitzen jedoch einen großen Einfluss auf den Metabolismus und somit auf das Wachstum von Mikroorganismen.

Aus diesem Grund ist die Nährstoffoptimierung der erste und für die meisten Mikroorganismen der am besten erforschte Schritt. Hierbei wird die Biomasse- oder Produktzunahme unter Variation der Makro- und Mikronährstoffe sowie deren Konzentrationen im Kultivierungsmedium analysiert. Ziel einer solchen Optimierung ist es, ein Medium zu entwickeln, in dem der prozessrelevante Stamm eine möglichst hohe Wachstumsrate, gepaart mit einer hohen Produktbildung aufweist. So konnte für den Hefestamm *C. oleaginosus* gezeigt werden, dass durch Zugabe verschiedener Nitratquellen zum Medium die Zunahme der Biomasse gesteigert werden konnte.⁶⁰ Ebenfalls wurde eine Zunahme der gebildeten Biomasse durch Variation der vorhandenen Kohlenstoffquellen nachgewiesen.⁶⁰

In vielen Fällen wird jedoch ein zweistufiger Prozess benötigt, der in einem ersten Schritt, wie beschrieben, eine optimierte Biomasseproduktion gewährleistet. Der zweite Schritt ist die Analyse von Nährstofflimitierungen und deren Auswirkung auf den Metabolismus der spezifischen Mikroorganismen sowie der damit verbundenen Produktanreicherung. Es konnte

erreicht werden, dass die Lipidproduktion von Mikroalgen und oleogenen Hefen durch die Eliminierung von verfügbaren Stickstoff- bzw. Phosphatquellen um einen Faktor von bis zu 2,5 gesteigert wurde.⁶⁶ Ein weiteres Beispiel ist die Produktionsoptimierung von Astaxanthin durch die Mikroalgen *C. sorokiniana* und *Tetraselmis sp.*⁶⁷ Hierbei wurde durch Zugabe von Acetat oder einer Variation des Natriumchloridgehaltes eine höhere Ausbeute an Astaxanthin erreicht.⁶⁷

Weitere Stressoren

Neben der Optimierung der Nährstoffquellen gibt es weitere Faktoren, die die Produktivität von Mikroorganismen steigern können. Hierzu zählen ungünstige Umweltbedingungen wie starkes Licht, erhöhter Salzgehalt oder Veränderungen der Kultivierungstemperatur. Auch eine Kombination von verschiedenen Stressoren wird häufig verwendet, um eine spezifische Produktionsänderung zu erreichen.

So werden Mikroalgen durch Veränderung der Beleuchtungsstärke angeregt, höhere Mengen an Lipiden zu bilden.^{68,69} Zusätzlich kann eine Steigerung der Anfangsbeleuchtung zu einer späteren Zunahme der Lipidmasse führen. Für die Mikroalge *Haematococcus pluvialis* konnte gezeigt werden, dass sie als Reaktion auf Umweltstress größere Mengen an Astaxanthin zur Abwehr bildet.⁷⁰

Jedoch können im Gegensatz hierzu Stressfaktoren wie Salzstress, toxische Stoffe oder Veränderungen der Kultivierungsparameter auch hemmend auf die Biomasse- oder Produktgewinnung wirken. Es konnte gezeigt werden, dass Süßwasseralgen unter Zugabe von Natriumchlorid ein verlangsamtes Wachstum aufweisen.⁷¹

Zudem haben Stressfaktoren einen Einfluss auf den Metabolismus von Hefen. So führen erhöhte Ethanol-Konzentrationen zu einer Veränderung in den Membranen der Hefen. Diese wiederum sorgt für eine verminderte Aufnahme von Nährstoffen und eine damit verbundene Reduzierung des Zellwachstums.⁷² Auch der schon bei Mikroalgen beobachtete osmotische Stress durch Salz führt zu einem verminderten Wachstum der Hefe.⁷² Im Gegensatz hierzu kann eine Erhöhung der Temperatur während des Prozesses der Brotherstellung mit *S. cerevisiae* zu einer Reduktion der für den Menschen schädlichen Ochratoxin A führen.⁷³

1.3.4 Genetische Optimierung

Neben der Anpassung des Nährstoffmediums an den jeweiligen Mikroorganismus sowie der Produktzunahme durch Anwendung von Stress bilden Eingriffe in das Erbmateriale von Mikroorganismen eine weitere Möglichkeit der Produktionsoptimierung.⁷⁴ Die gentechnische Veränderung kann hierbei auf verschiedene Bereiche wirken. So ist es möglich, durch Integration von neuen bzw. weiteren Transportsystemen das Spektrum an verwertbaren Kohlenstoffquellen zu erweitern oder die Substrataufnahme zu steigern.⁷⁵ Dies wurde für die Hefe *S. cerevisiae* gezeigt, welche nach der genetischen Einbringung des Glucose/Xylose-Faktor Gxf1 aus *Candida intermedia* in der Lage war, auf niedrigen Xylosekonzentrationen, verglichen zum Referenzstamm, eine deutlich höhere Wachstumsrate zu erreichen.⁷⁶ Gleiches gilt für die Hefe *Yarrowia lipolytica*, welche durch Überexpression des mitochondrialen Transporters MTT und die damit verbundene optimierte Aufnahme von cis-Aconitsäure eine gesteigerte Bildung von Itaconsäure aufweist.⁷⁷ Ein weiterer Punkt kann die Einbringung von neuen Enzymen sowie deren Sekretion sein. Hierdurch können Mikroorganismen auch langkettige Polymere wie Zellulose extrazellulär spalten und die entstehenden Mono- und Dimere metabolisch verwerten.⁷⁸ Dies wurde unter anderem mit *S. cerevisiae* bewiesen, die nach Einbringung einer Endoglucanase (*Trichoderma reesei*) und einer β -Glucosidase (*Saccharomycopsis fibuligera*) mithilfe von amorpher Zellulose Ethanol produzieren kann.⁷⁹ Ein weiteres Beispiel ist die oleogene Hefe *Lipomyces starkeyi*, welche nach der genetischen Modifikation ebenfalls eine Endoglucanase sekretieren kann.⁸⁰

2 Methoden

2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Chlorella sorokiniana (*C. sorokiniana*)

Die Kultivierung der Mikroalge *C. sorokiniana* wurde mit BBM-Medium [Bold's Basal Medium] (Bischoff und Bold, 1963), jedoch wie Tabelle 4 zeigt ohne die Zugabe von organischen Nährstoffen, Vitaminen oder komplexen Komponenten, durchgeführt.⁸¹ Für die Anfertigung des Mediums wurden je Lösung von Stock 1 10 ml und von Stock 2 1 ml pro Liter Medium genommen.

Tabelle 4: Zusammenstellung des Bold Basal Mediums

Bold Basal Medium	
Stock 1	pro 400ml
Natriumnitrat	10 g
Magnesiumsulfat	3 g
Natriumchlorid	1 g
Dikaliumhydrogenphosphat	3 g
Kaliumdihydrogenphosphat	7 g
Calciumchlorid	1 g
Stock 2	pro Liter
Zinksulfat	8.82 g
Mangan(II)-chlorid	1.44 g
Molybdän(VI)-oxid	0.71 g
Kupfersulfat	1.57 g
Cobalt(II)-nitrat	0.49 g
Borsäure	11.42 g
Ethylendiamintetraessigsäure	50 g
Kaliumhydroxid	31 g
Eisen(II)-sulfat	4.98 g
Schwefelsäure (konz.)	1 ml

Die Mikroalgen wurden mit einer OD_{750} von 0,1 inkubiert und für 14 Tage unter $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Beleuchtung, sowie einer Begasung von mit 1% CO_2 angereicherter Luft kultiviert. Nach Abschluss der 14 Tage wurden den Kulturen Proben entnommen. Außerdem wurde im Anschluss ein Versuch zur Ermittlung der Konzentration an Folat, sowie dessen Vitamerenverteilung nach Anwendung von Stress untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Kulturen gepoolt und in Chargen ab zentrifugiert. Um den Einfluss von Stressoren zu analysieren wurden die Mikroalgen osmotischem Stress, Stickstofflimitierung und einer Verschiebung des Licht Spektrums. Hierzu wurden die Pellets in 200ml frischem BBM-Medium resuspendiert, welches je nach Ansatz variierte. Der osmotische Stress erfolgte durch Zugabe von 1% NaCl haltigem BBM-Medium, die Stickstofflimitierung mit NaNO_3 freiem BBM-Medium und veränderten Wellenlängen der Beleuchtung (Grün, Blau/Rosa). Alle Ansätze wurden in Triplikaten angesetzt und später gegen eine Kontrolle verglichen.

Oleogene Hefe *C. oleaginosus*

Für den Nachweis des Kohlenhydrateinflusses wurde *C.oleaginosus* in Medium kultiviert, welches Yeast Nitrogen Base (YNB)(Zusammensetzung siehe Tabelle 5) enthält. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz 20 g/l der entsprechenden Kohlenstoffquelle. Als Vorkultur wurden 30 ml glukosehaltige YNB-Lösung mit *C. oleaginosus* angeimpft und für 24 h inkubiert. Die Wachstumsparameter betragen hierbei, wie bei den anschließenden Kultivierungen, 120 U/min und 28°C . Nach der Vorkultivierung wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit hohen Schikanen, welche mit 150 ml YNB-Medium enthielten, mit einer optischen Dichte von 0,1 bei 600 nm beimpft und für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen für 7 min bei 6738 g ab zentrifugiert, das Pellet in 150 ml frischen Medium (ohne Kohlenstoffquelle) resuspendiert und wieder in Schikanekolben gefüllt. Es erfolgte eine Zugabe verschiedener Kohlenhydrate (Glukose (Kontrolle), Cellobiose, Maltose, Lactose, Saccharose und Trehalose) und eine 2 tägige Kultivierung. Alle Ansätze wurden in biologischen Replikaten durchgeführt.

Tabelle 5: Zusammenstellung des Yeast Nitrogen Base Mediums

YNB (pH 5.4)	
Ammoniumsulfat	5,0 g/l
Kaliumphosphat	1,0 g/l
Magnesiumsulfat	0,5 g/l
Calciumchlorid	0,1 g/l
Natriumchlorid	0,1 g/l
Inositol	2,0 mg/l
Borsäure	0,5 mg/l
Niacin	0,4 mg/l
Thiaminhydrochlorid	0,4 mg/l
Pyridoxinhydrochlorid	0,4 mg/l
Calciumpantothenat	0,4 mg/l
Mangansulfat	0,4 mg/l
Zinksulfat	0,4 mg/l
P-Aminobenzoessäure	0,2 mg/l
Eisenchlorid	0,2 mg/l
Riboflavin	0,2 mg/l
Natriummolybdat	0,2 mg/l
Kaliumjodid	0,1 mg/l
Kupfersulfat	0,04 mg/l
Biotin	0,002 mg/l
Folsäure	0,002 mg/l
Folsäure	0,002 mg/l

2.2 Fettsäureanalyse

Um die Lipide der oleogenen Mikroalgen und Hefen mittels Gas-Chromatographie zu analysieren sind Fettsäuremethylester (FAMES) notwendig. Dies wurde nach der Methode von Griffiths mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Zur Analyse wurden je Probe 10 mg an lyophilisierter Biomasse verwendet. Der interne Kontrollstandard C17-TAG wurde durch einen C19-TAG der Firma Sigma Aldrich T4632 (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) ersetzt. Im ersten Schritt wurde die Extraktion der Fettsäuren im Eis gekühltem Ultraschallbecken von 20 min auf 40 min erhöht um einen besseren Aufschluss zu gewährleisten. Die anschließende Umesterung mit BF₃-Methanollösung wurde mit einem HCL/Methanol-Gemisch (Supleco 17935-Lösung, Merck AG, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. In einem weiteren Schritt wurden die FAMES mit GC-Grade-Hexan durch zehnstündiges Vortexen extrahiert. Hierbei wurden zum besseren Aufschluss Glasperlen hinzugegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation mit 1000U/min wurde die Hexanphase entnommen und in ein GC-Gefäß überführt.¹⁴⁸

Die Messung wurde mit einer Zebron™ ZB-Wax-Trennsäule (Phenomenex, Aschaffenburg) mit einer Säulenlänge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,32 mm und einer

Schichtdicke von 0,25 µm durchgeführt. Hierbei wurde im Verhältnis 1:10 Wasserstoff als Stützgas und Stickstoff als Make-up-Gas verwendet. Die Temperatur des Injektors wurde auf 240 °C und die des Flammenionisationsdetektors auf 245 °C eingestellt. Die Trennung der unterschiedlichen FAMES erfolgte über einen Temperaturgradienten, wobei die Messung bei 150 °C startete, die Temperatur je Minute um 5 °C erhöht wurde und nach Erreichen der Endtemperatur von 240 °C für 6 min gehalten wurde.¹⁴⁸

Im Anschluss wurden die Fettsäureprofile mit einem Shimadzu GC-2025 gemessen, der mit einem FID-Detektor (245°C) und einem AOC-20i-Autosampler ausgestattet war (Shimadzu, Kyoto, Japan). Jede Probe wurde auf eine Zebron ZB-WAX-Säule (30 m × 0,32 mm, Dicke von 0,32 µm, Phenomenex, Torrance, USA) bei einer Temperatur von 240 °C und einem Splitverhältnis von 1:10 geladen. Der Säulenofen wurde für 1 min auf 150 °C eingestellt und erhöhte seine Temperatur (5 °C/m) bis zu einer finalen Temperatur von 240 °C, welche für 6 min gehalten wurde. Als Trägergas fungierte, mit einer konstanten Flussrate von 35 ml/min, Wasserstoff 5.0. Die abschließende Identifizierung erfolgte über eine manuelle Kalibrierung mit dem externen Standard Marine oil FAME Mix (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Eine relative Quantifizierung erfolgte durch integralen FID-Signalvergleich nach Normalisierung und Ausschluss des internen C19-FAME-Standards.¹⁴⁸

2.3 Proteinextraktion

Zur fraktionierten Analyse der Hefe Proteine (sezernierte, Zellwand assoziierte, intrazelluläre) wurden die *C. oleaginosus* Zellen zunächst bei 6738 g für 7 min ab zentrifugiert und durch anschließende Abnahme des Überstandes die sezernierte Fraktion gewonnen. Zur Gewinnung der Zellwand assoziierten Proteine wurde das Pellet in 25 ml NaCl mit einer Konzentration von 150 mM resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation bei RT mit 20133 g für 7 min von den Hefezellen abgetrennt. Das Pellet wurde in 15 ml NaCl (150 mM) resuspendiert und mit einem Hochdruckhomogenisator bei 8 bar aufgeschlossen. Nach Extraktion der cytoplasmatischen Proteine wurden diese durch Zentrifugation bei 20133g für 7 min von den Zelltrümmern getrennt. Zur weiteren Probenaufbereitung wurden durch Filtration mit einem 0,45 µm-Filter in den sekretierten, Zellwand assoziierte und cytoplasmatische Fraktionen verbleibende Zelltrümmer entfernt, die Proteine mit einer 10% Trichloressigsäure (v/v) für 30 min bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation bei 20133 g für 10 min bei 4°C abgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteinpellets zweimal mit Methanol HPLC-Grade) und dreimal mit Aceton (HPLC-Grade) gewaschen und anschließend über Nacht bei RT getrocknet. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation bei 20133 g für 10 min bei 4°C und der Überstand wurde stets verworfen. Die getrockneten Proteinpellets wurden

zum Abschluss in 8 M Harnstoff gelöst und die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 260/280 nm bestimmt.¹⁴⁸

2.4 Proteinaufreinigung für LC MS/MS Analyse

Zur Aufreinigung der Proteine wurden diese auf einer 10%igen SDS PAGE in Gel einlaufen gelassen und die entstandenen Proteinbanden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue eingefärbt. Die nun sichtbaren Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die Peptide nach Shevchenko et al. und Granvogl et al. mit Modifikationen isoliert: Die extrahierten Gelstücke wurden zerkleinert (<1 mm³) und, um das Coomassie Brilliant Blue vollständig zu entfernen, mit Acetonitril gewaschen.^{82,83} Danach erfolgte eine Trocknung der Gelstücke für 15 min unter Vakuum (SpeedVac). Die getrockneten Proben wurden für 30 min bei 56 °C mit 10 mM Dithiothreitol und 50 mM Ammoniumbicarbonat reduziert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Acetonitril, wurde eine Alkylierung (55 mM Iodacetamid, 50 mM Ammoniumbicarbonat) für 20 min bei RT durchgeführt. Die Alkylierungslösung wurde durch zwei weitere Waschschriffe mit Acetonitril entfernt und die Proben unter Vakuum für 15 min getrocknet (SpeedVac). Die trockenen Proben wurden unter Zugabe einer Verdauungslösung, welche Trypsin Gold (Promega: V5280) enthielt, gemäß den Herstellerangaben rehydriert. Der enzymatische Verdau wurde über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Die entstandenen Peptide wurden durch verschiedene Waschschriffe (je 15 min) mit Acetonitril, Ammoniumbicarbonat und 5% Ameisensäure extrahiert, die gesammelten Lösungen gepoolt und unter Vakuum getrocknet. Für die anschließende Resuspendierung wurde 1% Ameisensäure verwendet. Vor der LC-MS/MS Analyse wurden die Proben durch einen 13,3 kDa Spin-Filter gereinigt.¹⁴⁸

LC-MS/MS analysis, protein identification, and quantification

The protein analysis was performed, using a timsTOF Pro mass spectrometer coupled with a NanoElute LC System (Bruker Daltonik GmbH, Germany), equipped with an Aurora column 250 x 0.075 mm, 1.6 µm (IonOpticks, Australia). The mobile phase consisted of a 0.1% (v/v) water-formic acid mixture (A) and a 0.1% (v/v) acetonitrile-formic acid mixture (B), which was added as a binary gradient, at a flow rate of 0.4 µL/min. The gradient concentration started at 2% (v/v) B and was increased to 17% B after 36 min. After a further 18 min, 25 % (v/v) B was added and again increased to 37 % B, after a further 6 min. After 70 min, the concentration of B was adjusted to the final value of 95 % (v/v). The oven temperature during the measurement was 50 °C.¹⁴⁸

The timsTOF pro-mass spectrometer was used in PASEF Mode with the following settings: mass range 100 – 1700 m/z, ion mobility ramp 0.6 - 1.6 V*s/cm², 10 MS/MS Scans per ion mobility ramp (total cycle time 1.16 sec), charge range 0 – 5, active exclusion for 0.4 min, a target intensity of 20000 and an intensity threshold of 1000. Collision energy was ramped stepwise, appropriate to the ion mobility ramp, from 20 to 59 eV. The ESI source parameters were 1600 V for the capillary voltage, 3 L/min N₂ as dry gas, and dry gas temperature of 180°C. The measurements were performed in a positive mode. Mass calibration was done with sodium formate cluster and the TIMS was calibrated using Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene, Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phosphazene and Chip cube high mass reference (m/z 622, 922 and 1222).^{84,85}

2.5 Bioinformatische Auswertung

Die Peptid- und anschließende Proteinidentifizierung wurde mit der Software PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc., 204-470 Weber St N, Waterloo, ON N2L 6J2, Canada)^{86–88} unter Verwendung der *C. oleagnosus*-Proteinsequenzen aus der UniProt-Datenbank durchgeführt.⁸⁹ Die Quantifizierung der relativen Proteinintensitäten wurde als Verhältnis der Proteinintensitäten (PEAKS) normalisiert auf die Gesamtproteinintensitäten (PEAKS) aus der jeweiligen Probe berechnet - drei biologisch unabhängige Messungen (biologische Triplikate). Für jedes Protein wurde eine Signifikanzanalyse mit einem Zwei-Stichproben-t-Test durchgeführt. Glykosylierte Peptide aus den sekretierten Fraktionen wurden durch die in PEAKS implementierten verfügbaren PMTs identifiziert. Mit den identifizierten Proteinsätzen (Proteinfraktionen und Kohlenhydrate) wurde eine Schnittmengenanalyse durchgeführt, um repräsentative Gruppen und Venn-Diagramme zu erzeugen (<http://www.interactivenn.net>, Stand 14.09.2020).¹⁴⁸

Die Klassifizierung der Proteine in die Gene Ontology (GO) Klassen, Bioprozess, zelluläre Funktion und molekulare Funktion wurde mit der Software OmicsBox (Firma, Version 1.3.11) unter Verwendung der identifizierten Proteinsätze (PEAKS) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine Blast-Suche gegen die CloudBlast-Datenbank und ein Interpro-Scan auf CloudIPS durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine gemappt und annotiert, bevor sie den jeweiligen Klassen zugeordnet wurden.¹⁴⁸

Für eine genauere funktionelle Analyse der identifizierten potenziellen Hydrolasen wurden sequenzähnliche Enzyme mithilfe der Software Swissmodel^{90–94} und Uniprot⁸⁹ identifiziert.

3 Publikationen

3.1 Zusammenfassung der eingebundenen Publikationen

Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay

Der Artikel "Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay" wurde am 21.01.2020 im Journal *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* veröffentlicht.

Die Autoren Dirk Volker Woortman, Tobias Fuchs und Lisa Striegel sind zu gleichen Teilen an der Veröffentlichung dieser Arbeit beteiligt und haben zusammen die Arbeit geplant, die Experimente durchgeführt und ausgewertet, sowie das Manuskript geschrieben.

Die Publikation "Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay" berichtet von Forschungsergebnissen, die während eines Mikroalgen Screenings gemessen wurden. Mikroalgen werden immer mehr als Zusatzmittel in Lebensmittelprodukten gehandelt. Sie gelten auf Grund ihrer Vielzahl an für den Menschen wichtigen Inhaltsstoffe, wie Proteinen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und wichtigen Vitaminen, als gesundheitsfördernd. So finden sie heute schon in Produkten, wie Smoothies oder anderen Lebensmitteln Verwendung. Jedoch müssen die Prozesse in puncto Kosteneffizienz optimiert werden. Aus diesem Grund wurde der Folatgehalt von halophilen Mikroalgen untersucht, da diese kostengünstiger in ozeanischem Wasser kultiviert werden könnten. Da nach aktuellem Stand nur zwei Süßwasseralgen für den menschlichen Verzehr zugelassen sind, wurde zusätzlich der Einfluss von Salzstress auf die Folatbildung in Süßwasseralgen in der Publikation betrachtet. Außerdem wurden weitere potenzielle Stressfaktoren, wie Stickstofflimitierung und unterschiedliche Wellenlängen der Beleuchtung analysiert. Die Veränderung der Wellenlänge zeigte im Gegensatz zu der starken Reduzierung durch Salz- und Limitierungsstress nur geringe Änderungen. Die Analyse der Folatgehalte in den halophilen Mikroalgen bestätigte vorangegangene Studien und übertraf diese durch neue Stämme, wie *Picochlorum* sp., welcher 6470 µg/100 g Folat bildete (aktuell höchster nachgewiesener Wert in Mikroalgen). Zur Analyse der Folatgehalte wurde im Gegensatz zu vorherigen Studien eine neue HPLC-basierte Methode verwendet. Diese erlaubt eine bessere Quantifizierung der Folatgehalte. Ebenfalls wurden erstmals massenspektrometrische Informationen zur genauen Detektion von Folatisomeren in Mikroalgen durchgeführt.

Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology

Der Artikel "Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology" wurde am 06.10.2020 im Journal accepted.

Der Autor dieser Arbeit, Tobias Fuchs, hat geholfen die Arbeit zu planen, die Experimente durchgeführt und auszuwerten, sowie an der Anfertigung des Manuskriptes beteiligt.

Die Publikation "Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology" berichtet von Forschungsergebnissen, die zur Grundlagenforschung an der oleogenen Hefe *C. oleaginosus* durchgeführt wurden. Hefen sind ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die zahlreiche Nischen besiedelt haben. Sie sind in der Lage, verschiedene in ihrem Lebensraum vorhandene Kohlenstoffquellen zu nutzen. Die erfolgreiche Nutzung hängt dann von der korrekten Erkennung und Verstoffwechslung der nutzbaren Kohlenstoffquellen durch Aktivierung von Stoffwechselwegen ab. Die Erforschung oleogener Hefen spielt eine besondere Rolle, da sie, durch ihre Eigenschaft hohe Konzentrationen an Lipiden zu akkumulieren, für viele Prozessentwicklungen interessant sind. Um diese Prozesse zu optimieren ist ein Einblick in die Kohlenhydrataufnahme und -verstoffwechslung nötig. Hierzu wurde der Einfluss von verschiedener Di- und Trisaccharide als einziger Kohlenstoffquelle auf die Proteinregulation von *C. oleaginosus* detailliert analysiert. Dabei konnten Wachstums- und morphologische Veränderungen beobachtet werden. Zusätzlich wurden in dieser Studie sekretierte, zellwandassoziierte und cytoplasmatische Proteine mittels LC-MS/MS identifiziert. Danach wurden die Verteilung der einzelnen Enzymklassen in den unterschiedlichen Fraktionen ermittelt. Durch relative Quantifizierung der spektralen Intensitäten wurden Expressionsregulierungen ermittelt, welche neue Einblicke in die Proteinsekretion und in die molekularen Mechanismen von Carbo-Hydrolasen geben, die an der Spaltung von Kohlenstoffoligomeren beteiligt sind. Außerdem konnten durch Sequenzanalysen in diesen Datensätzen mögliche Motive der Proteinsekretion aufdecken werden.

**Microalgae a Superior Source of Folates:
Quantification of Folates in Halophile
Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay**



Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay

Dirk Volker Woortman^{1†}, Tobias Fuchs^{1†}, Lisa Striegel^{2†}, Monika Fuchs¹, Nadine Weber², Thomas B. Brück^{1*} and Michael Rychlik^{2,3*}

¹ Werner Siemens-Chair of Synthetic Biotechnology, Technical University of Munich, Garching, Germany, ² Chair of Analytical Food Chemistry, Technical University of Munich, Freising, Germany, ³ Centre for Nutrition and Food Sciences, Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

OPEN ACCESS

Edited by:

Sónia Patrícia Marques Ventura,
University of Aveiro, Portugal

Reviewed by:

Minnamari Edelmann,
University of Helsinki, Finland
Michael Lakatos,
Hochschule Kaiserslautern University
of Applied Sciences, Germany

*Correspondence:

Thomas B. Brück
brueck@tum.de
Michael Rychlik
michael.rychlik@tum.de

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Industrial Biotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 28 May 2019

Accepted: 23 December 2019

Published: 21 January 2020

Citation:

Woortman DV, Fuchs T, Striegel L,
Fuchs M, Weber N, Brück TB and
Rychlik M (2020) Microalgae a
Superior Source of Folates:
Quantification of Folates in Halophile
Microalgae by Stable
Isotope Dilution Assay.
Front. Bioeng. Biotechnol. 7:481.
doi: 10.3389/fbioe.2019.00481

A multitude of human nutritional supplements based on *Chlorella vulgaris* biomass has recently been introduced to the specialty food market. In this study, an analysis of total folate contents in *Chlorella* sp. and a series of marine microalgae was conducted to evaluate folate content in alternative algae-based food production strains. For the first time, total folate content and vitamers distribution in microalgae were analyzed by stable isotope dilution assay (SIDA) using LC-MS/MS, which has demonstrated its superiority with respect to folate quantification. Consistently, high folate contents were detected in all examined microalgae samples. High folate concentrations of $3,460 \pm 134 \mu\text{g}/100 \text{g}$ dry biomass were detected in freshly cultivated *Chlorella vulgaris*, notably also in other well-researched microalgae strains. To that end, the highest folate content currently documented for any algae sample was measured in the marine microalgae *Picochlorum* sp. isolate with values of $6,470 \pm 167 \mu\text{g}/100 \text{g}$ dry biomass. This calls for alternative products based on other algae biomass. Our data indicate that freshwater and marine microalgae provide extremely high concentrations of folates, which warrant further studies on the regulation of pteroylpolylglutamates in algae as well as on bioaccessibility, absorption, and retention in humans.

Keywords: stable isotope dilution assay, microalgae, folates, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Picochlorum*

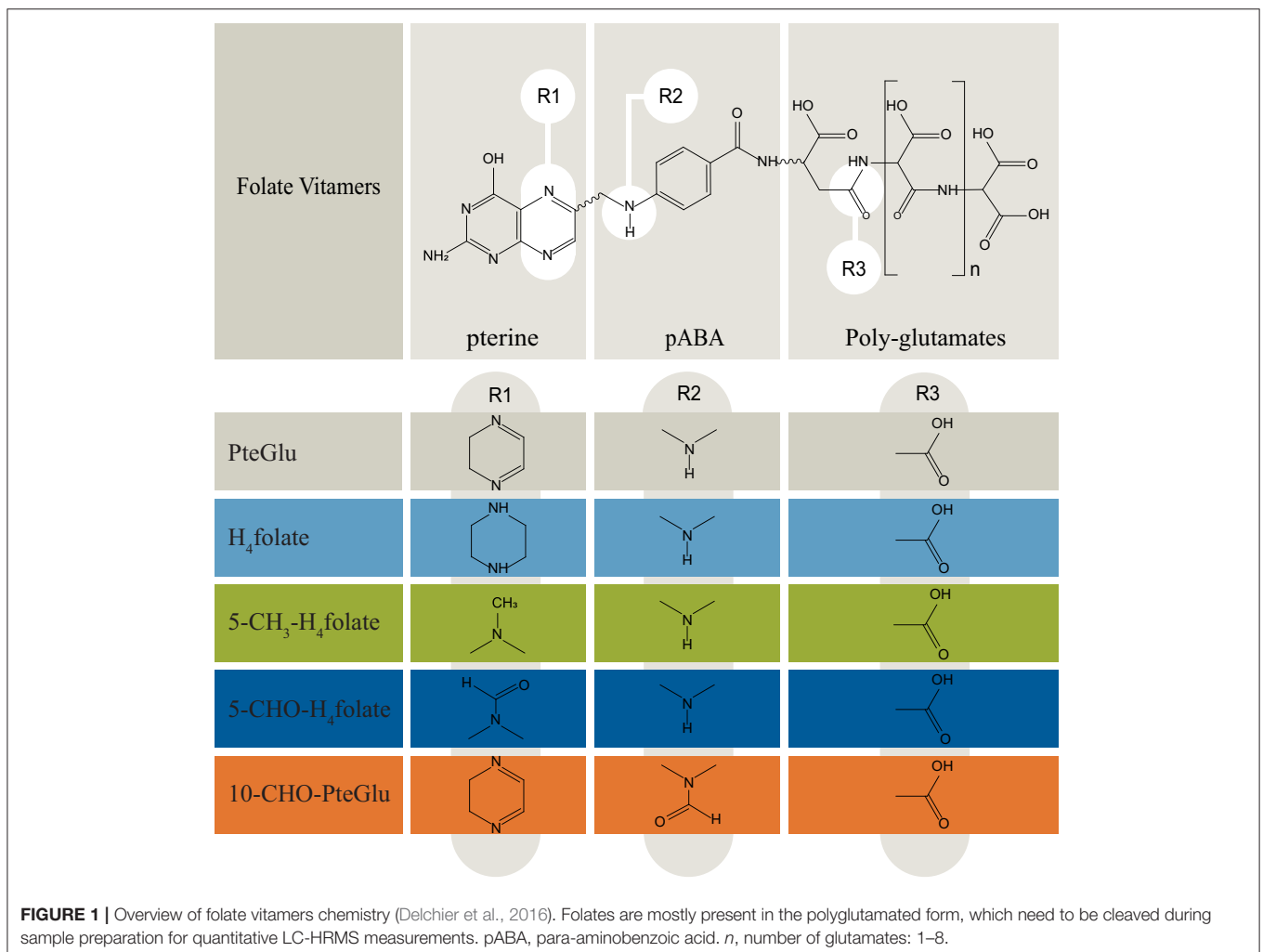
INTRODUCTION

With an ever-growing global population and increasing limiting availability of agricultural land, there is a growing demand for edible biomass that contains high concentrations of macro- and micronutrients (Tilman et al., 2002; Foley et al., 2011; Lipper et al., 2014). This situation is further aggravated by climate change effects, which ultimately lead to a shift and total reduction of agricultural lands (Tilman et al., 2001). Hence, generating nutrient concentrated, edible biomass on non-agricultural landmass is a pivotal role for a food-centered, future biorefinery approach (Laurens et al., 2017; Sheppard et al., 2019). To that end, microalgae potentially yield at least five times more biomass than terrestrial plants on the equivalent land surface and can be cultivated without the need for freshwater (Benedetti et al., 2018). Therefore, microalgae cultivation does not compete with terrestrial agricultural activity but can act synergistically to generate

concentrated food resources (Vanthoor-Koopmans et al., 2013). Hence, generating a microalgae-based biorefinery that generates various performance nutrient outlets, such as proteins, sugars and polyunsaturated fatty acids can significantly contribute to meet food demands of future generations (Subhadra and Grinson-George, 2011). While microalgae-based production of macronutrients such as sugars and proteins has been elucidated extensively in the literature, detailed studies on micronutrient, such as vitamins, which add significant economic and nutritional value to food-centered microalgae biorefinery, have been limited (Pulz and Gross, 2004; Draaisma et al., 2013; van der Spiegel et al., 2013). In that respect, Vitamin B9 (Folate) is of extensive importance due to its function in human development and health maintenance. The marine microalgae have recently been flagged as concentrated food production platforms for human and animal nutrition due to their high concentration of health-promoting nutrients, such as proteins and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Harun et al., 2010; Grosso et al., 2014; Kent et al., 2015; Marventano et al., 2015). It has been reported that high vitamin containing algae biomass could be used to

address malnutrition in populations at risk, which not only encompass pregnant women with higher nutritional demands, but also poverty-stricken populations (Pratt and Johnson, 1965; Brown et al., 1999; Becker, 2003; Christaki et al., 2011). A multitude of human nutritional supplements based on algae biomass has recently been introduced. Nevertheless, the oft-cited nutritional value of algae food supplements with respect to their micronutrient content and bioavailability is still a matter of scientific debate (Brown et al., 1999; Wells et al., 2017).

Folate vitamins are essential to human nutrition and necessary for many one carbon metabolic pathways, particularly in the synthesis of amino acids and nucleotides (Shane, 1989). A deficiency of folates in women before and during pregnancy is related to an increased prevalence of neural tube defects (NTDs) in newborns. In contrast to humans, plants synthesize folates *de novo* and, therefore, provide dietary folates for humans. These compounds are accruing in all cellular compartments, such as mitochondria, cytoplasm, and nucleus, where they carry out distinct biochemical functions (Selhub, 2002). Folates consist of three different chemical building



blocks, i.e., pterin, para-amino benzoic acid (pABA), and varying numbers of glutamate residues. Depending on the oxidation state, various C1 substituents, and the polyglutamyl tail lengths, the most abundant forms in plants are H₄folate (tetrahydrofolic acid; 2-((4-((2-Amino-4-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-1H-pteridin-6-yl)methylamino)benzoyl)-amino)pentandisäure), 5-CH₃-H₄folate (5-methyltetrahydrofolate; (2S)-2-[[4-[(2-Amino-5-methyl-4-oxo-1,6,7,8-tetrahydropteridin-6-yl) methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid), 5-CHO-H₄folate (5-formyltetrahydrofolate, 2-[[4-[(2-amino-5-formyl-4-oxo-3,6,7,8-tetrahydropteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid), 10-CHO-PteGlu (10-formyl-folate (2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-3H-pteridin-6-yl)methyl-formylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid), and PteGlu (pteroylglutamate (2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-3H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid) (Hanson and Gregory, 2002). The structures of folate vitamers analyzed throughout this study are illustrated in **Figure 1**.

Since there is an increased interest in the use of microalgae as functional food, the quantitative analysis of folates in well-characterized strains would add significantly to knowledge about the nutritional composition and value of microalgae. At present, there is only scattered information about the total folate content of microalgae biomass. Two publications presented microbiological assays for quantification with limited analytical robustness (Brown et al., 1999; Fujii et al., 2010). Folate quantification by microbiological assays are sensitive, but the results are biased by choice of the calibrants and reagents (Ringling and Rychlik, 2017a). Recently, Edelmann et al. published reliable folate data on commercially available microalgae using microbiological assay and an UHPLC method (Edelmann et al., 2019). However, using UHPLC, particular attention to a complete deconjugation of polyglutamates to the respective monoglutamates need to be paid as only monoglutamates can be detected (Ringling and Rychlik, 2017a). For a direct, reliable, and sensitive analysis, we applied a mass spectrometry-based stable isotope dilution assay (SIDA), which has demonstrated its superiority in folate quantification (Rychlik, 2011). SIDA is based on the application of isotopologic labeled internal standards, which present almost identically chemical and physical properties. As pointed out above SIDA has key advantages such as a complete compensation for losses of analytes during extraction and for ion suppression during LC-MS/MS measurements. Folate analysis using SIDA enables differentiation of the folate pattern (Asam et al., 2009) as well as the detection of an incomplete deconjugation by LC-MS/MS (Ringling and Rychlik, 2017a).

This study evaluates the differential folate content of industrial processed microalgae biomass including fresh biomass and strains isolated from the environment. We examined the folate content of lab-grown microalgae, in particular also marine microalgae as these organisms display higher process robustness in extreme saline media, and can be cultivated on non-arable land using sea, brackish or wastewater (Schenk et al., 2008). Additionally, it prevents culture instability in open pond reactor systems as many terrestrial contaminants, such as bacteria and

filamentous fungi, cannot thrive in this medium (Rothschild and Mancinelli, 2011). Therefore, the large scale halophilic algae cultivation potentially shows better economic and ecological benchmarks than its freshwater equivalents (Schenk et al., 2008; Apel and Weuster-Botz, 2015). At present, there is little literature evidence of the nutritional value, specifically focused on folate production and vitamers with respect to halophilic algae strains (Kay and Barton, 1991; Brown et al., 1999; Fujii et al., 2010; Wells et al., 2017). We hypothesize, that in general halophilic green microalgae contain higher excess of folates compared to terrestrial, folate containing food sources, such as rice, strawberries and liver. In this context, it is noteworthy that there is currently no systematic study that elucidates algae strains with a specific analytical procedure that can distinguish folate vitamers species. Moreover, it has not been elucidated yet if processed biomass retains high folate contents compared to its freshly harvested counterpart. Thus, we analyzed total folates contents in freshwater and marine microalgae by SIDA using LC-MS/MS and examined the effects of different industrially applied cultivation conditions on total folate content.

MATERIALS AND METHODS

Commercial Grade Food Supplements

Biomass was sampled from algae food supplement products obtained from Terra Elements GmbH, Munich, Germany (*Chlorella vulgaris*) and Feelgood Shop BV, RK Venlo, Netherlands (*Chlorella vulgaris*). A single batch analysis was performed. The products were bought as dried powders and analyzed unprocessed.

Cultured Reference Strains

Reference microalgae strains found in **Table 1** were obtained from the Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) and the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Sample strains were transferred and adapted under sterile culture conditions to growth media.

Cultured Isolated Strains

Isolated microalgae strains were enriched and purified from Australian environmental samples obtained in August 2014 by Thomas Brueck and coworkers under permission of the Australian government. Preparation of repeated serial dilution cultivations resulted in unialgal cultures after sampling. Maintained unialgal cultures were checked for purity by microscopy (Zeiss AxioLab, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) and in high throughput by fluorescence-activated cell sorting analysis (Biorad S3 Sorter, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA).

Microalgae Cultivation

All reference and isolated microalgae samples were cultured in 500 ml Erlenmeyer flasks with a fill volume of 200 ml in New Brunswick Innova 44 series shakers (26°C, 120 rpm) fitted with light emitting diodes (Future LED GmbH, Berlin, Germany) (**Figure S1**). The cultures were inoculated with

TABLE 1 | Overview of analyzed microalgae biomass.

Genus; species; strain	Origin [country, place (CC ID)]	GPS coordinates (DMS)	Medium	NaCl content (w/v)
COMMERCIAL GRADE FOOD SUPPLEMENTS				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Terra Elements GmbH, Munich, Germany	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Feelgood Shop BV, Venlo, Netherlands	n.a.	n.a.	n.a.
CULTURED REFERENCE STRAINS				
<i>Chlorella vulgaris</i>	n.a. (SAG 211-12)	n.a.	BG11	0%
<i>Porphyridium purpureum</i>	UK, Brixham (CCAP 1380/3)	n.a.	ASW	3%
<i>Microchloropsis salina</i>	UK, Isle of Cumbrae (SAG 40.85)	N 055° 46.081', W 004° 55.18464	BG11	3%
CULTURED ISOLATED STRAINS				
<i>Picochlorum</i> sp. isolate	Australia, Salt Creek	S 036° 09.6874', E 139° 38.8328'	ASP-M	5%
<i>Dunaliella salina</i> isolate	Australia, Salt Creek	S 036° 09.6874', E 139° 38.8328'	J/1	5%
<i>Tetradasmus</i> sp. isolate	Australia, Salt Creek	S 036° 09.6874', E 139° 38.8328'	BG11	3%
<i>Chlorella</i> sp. isolate	Australia, Brisbane River	n.a.	BBM	0%

n.a., not available; NaCl, Sodium chloride; CC ID, Culture collection identification; DMS, Degrees-Minutes-Seconds.

fresh cultivars at a starting optical density of 0.1 (OD₇₅₀). A constant visible sunlight spectrum approximation illumination at a Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was applied. Individual aeration with 1% v/v CO₂ enriched air was controlled by a DASGIP® MX module (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). A constant gas flow equivalent to 6 head volume exchanges per hour was applied. After 14 days of cultivation, the resulting algae biomass was harvested by centrifugation (2,450 × g, 5 min). No washing steps were applied. Subsequently, the frozen pellet (−80°C) *Chlorella* sp. isolate was freeze-dried for 24 h. Dried samples were sealed under nitrogen-enriched air, subdued light and stored at −80°C until further processing. Moreover, the analysis of folate content and vitamers distribution after 14 days of cultivation and subsequent 24-h osmotic stress, nitrogen limitation and light spectrum shift was studied. A batch of 15 Erlenmeyer flask cultures were combined after 14 days. The homogeneous culture was pelleted by centrifugation (2,450 × g, 5 min) in individual batches and re-suspended in BBM medium for the control, green light and blue/pink light groups in triplicates. Nitrogen limited conditions were initiated by resuspension in NaNO₃ free BBM media. Osmotic stress was initiated by resuspension in 1% NaCl containing BBM media. After 24 h the cultures were harvested and stored for folate analysis as described above. LED spectrum is shown in **Figure S2**.

All cultivation media were prepared sterile. The microalgae media BG11 [Blue-Green Medium] (Allen, 1968), J/1 [Johnson's media] (Allen, 1968), ASW [Artificial Seawater] (Allen and Nelson, 1910), ASP-M [Artificial Seawater medium by Provasoli] (Provasoli et al., 1957) and BBM [Bold's Basal Medium] (Bischoff and Bold, 1963) were prepared as published, but without organic nutrients, vitamins or complex components; all media recipes were adapted accordingly and obtained from: BG11 and J/1 (Borowitzka and Borowitzka, 1988); BBM, ASW and ASP-M (Anderson, 2005). The salinities were adjusted by the addition of sodium chloride as listed in **Table 1**.

Phylogenetic and Fatty Acid Profile Characterization of Analyzed Biomass

Genomic DNA extracts were prepared using the InnuPrep plant DNA extraction kit (Analytic Jena AG, Jena, Germany, 845-KS-1060050). 18S rDNA amplification by PCR (Eppendorf AG, Germany, Mastercycler nexus) was conducted using the primers EukA (21F) (5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') (Medlin et al., 1988) and EukB (1791R) (5'-TGATCCTTCTGCAGG TTCACCTAC-3') (Medlin et al., 1988). The purified amplicons were sequenced by capillary sequencing (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany). The reads were searched against the GenBank database by the BLASTn (Altschul et al., 1990) algorithm. The nearest ancestral microalgae sequence hits of isolates were used for the lineage assignments. The phylogenetic tree was built with Geneious Tree Builder (Biomatters Ltd., New Zealand, Geneious software version 11.1.3). 18S rDNA data was included from deposited reference strains which are obtainable from SAG, UTEX, CCAP.

The Fatty Acid Methyl Esters (FAME) were prepared according to reported methods applied to microalgae biomass with the following modification (Griffiths et al., 2010): 10 mg lyophilized biomass of each sample was used; the internal standard C17-TAG was replaced by C19-TAG Sigma Aldrich T4632 (Merck AG, Darmstadt, Germany). Initial extraction with GC grade toluene was assisted by sonification for 40 min in an ice bath. BF₃ methanol was replaced by a HCl/Methanol Supleco 17935 solution (Merck AG, Darmstadt, Germany). After transesterification FAMES were extracted with GC grade hexane by vortexing with glass beads for 10 s at RT. After centrifugation for 5 min at 1,000 rpm, the hexane phase was transferred to GC-vials. The fatty acid profiles were measured with a Shimadzu GC-2025 equipped with a AOC-20i autosampler and FID detector (245°C) (Shimadzu, Kyoto, Japan). For each sample, 1 μl was injected with a split ratio of 1:10 at a temperature of 240°C and loaded on a Zebron ZB-WAX column (30 m × 0.32 mm, thickness of 0.32 μm , Phenomenex, Torrance, USA). The column oven temperature was set to 150°C for 1 min, a ramp of 5°C/min increased the temperature to a final target of 240°C. Thereafter

holding the final temperature for 6 min. Hydrogen 5.0 was used as carrier gas at a constant flow rate of 35 ml/min. Identification of peaks was done by manual calibration with the external standard Marine oil FAME Mix (Restek GmbH, Bad Homburg, Germany). A relative quantification was done by integral FID signal comparison after normalization and exclusion of the internal C19 FAME Standard.

Folate Content and Isoform Distribution Analysis on Microalgae Biomass

For the folate stable isotope dilution assay analysis, the complete information about chemicals, standards, and preparations of solutions as well as validation of the method can be obtained from a previous publication (Striegel et al., 2018b). Briefly, LODs of all analytes were in the range of 0.17 and 0.33 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, and LOQs in the range of 0.51 and 0.96 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Inter-injection precision was between 1.96 and 4.46%, intra-day precision between 2.44 and 4.60%, and inter-day precision between 3.04 and 5.06%. 10-CHO-PteGlu was quantified using [$^{13}\text{C}_5$]-5-CHO- H_4 folate as internal standard. The LODs and LOQs were estimated using the response factor of 5-CHO- H_4 folate as a reference value. We calculated a LOD of 0.14 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and a LOQ of 0.40 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. All results given in the results and discussion section are based on dry biomass.

Sample Preparation for the Folate Analysis of Algae Biomass

The sample extraction was performed under subdued light. Briefly, the freeze-dried algae samples were finely grounded using a mortar and pestle. Ten milligram of resulted biomass were used for each extraction. After addition of 10 ml buffer (200 nmol/l 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES), 114 nmol/l ascorbic acid, 0.7 nmol/l DTT, pH 5.0) internal standards ([$^{13}\text{C}_5$]-PteGlu, [$^{13}\text{C}_5$]- H_4 folate, [$^{13}\text{C}_5$]-5- CH_3 - H_4 folate, and [$^{13}\text{C}_5$]-5-CHO- H_4 folate [used for quantitation of 5-CHO- H_4 folate and 10-CHO-PteGlu]) were added to samples in equal amounts (0.004–0.5 nmol) to the anticipated respective analyte content. For deconjugation, an adjusted amount of 1 ml rat serum (used without dilution; endopeptidase used for deconjugation of diglutamates to monoglutamates) and 2 ml chicken pancreas suspension (1 g/l in phosphate buffer (100 mmol/l, 1 g/l ascorbic acid, pH 7); exopeptidase used for deconjugation of polyglutamates to the respective diglutamates) were added, and the samples were incubated overnight for a minimum of 12 h in a water bath at 37°C. After a 10 min boiling step, samples were cooled on ice and transferred into plastic centrifuge tubes with additional 10 ml acetonitrile. After centrifugation (20 min, 4,000 rpm, 4°C), the extracts were applied to a solid-phase extraction (SPE) clean-up using strong anion-exchange (SAX) cartridges (quaternary amine, 500 mg, 3 ml). In short, cartridges were activated with two volumes of methanol, equilibrated with 3 volumes of buffer [10 mmol/l phosphate buffer (consisting of 100 mmol/l sodium hydrogen phosphate and adjusting the solution with 100 mmol/l dipotassium hydrogen phosphate to pH 7.0) was mixed with 1.3 mmol/l DTT], extracts were completely applied, and cartridges were washed again with 3

volumes of buffer for equilibration and run dry. The folates were eluted using 2 ml of buffer for elution (5% sodium chloride, 1% ascorbic acid, 100 mmol/l sodium acetate, and 0.7 mmol/l DTT), membrane filtered, and measured by LC-MS/MS.

LC-MS/MS

Chromatography was carried out on a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a Raptor ARC-18 column (2.7 μm , 100 \times 2.1 mm, Restek, Bad Homburg, Germany) and a Raptor ARC-18 precolumn (2.7 μm , 5 \times 2.1 mm, Restek, Bad Homburg, Germany) as a stationary phase that was kept at 30°C. The mobile phase consisted of (A) 0.1% formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid delivered as a binary gradient at a flow rate of 0.4 ml/min. Gradient concentration started at 3% B and raised linearly to 10% within the next 2.5 min and held at 10% for further 2.5 min. Then, the concentration went up to 15% B within 5 min and then to 50% within 1 min, followed by holding at 50% B for 1 min. Within 1 min, the concentration returned to 3% B and was equilibrated for 4 min. The injection volume was 10 μl .

The LC was interfaced with a triple quadrupole mass spectrometer (LCMS-8050, Shimadzu, Kyoto, Japan). It was operated in the positive ESI mode for all analytes. The specified settings are also described previously (Striegel et al., 2018b). Data acquisition was performed with LabSolutions software 5.8 (Shimadzu, Kyoto, Japan). The ion source parameters were set as follows: heat block (400°C), dilution line (250°C), interface temperature (300°C), drying gas (10 l/min), heating gas (10 l/min), nebulizing gas (3 l/min), collision-induced dissociation gas (270 kPa), and interface voltage (4 kV), respectively. MS parameters were listed in the previously published paper about the method validation. The mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode for MS/MS measurements.

Statistical Evaluation

All folate results are means of technical triplicates \pm standard deviation. The received values were tested for normal distribution with the test of Kolmogorov-Smirnov and were tested for outliers by the test of Dixon. A significance test was carried out by the *T*-test after applying the *F*-test for heteroscedasticity. The level of statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

Within this project, a series of freshwater and marine microalgae were analyzed for their total folate content and vitamers distribution by SIDA based on dry biomass. For all cultured microalgae strains, we validated the lineage assignment by sample-specific fatty acid profiles and 18S rDNA sequence identity. To reflect on the analyzed diversity, we included a phylogenetic tree with reference strains from UTEX, SAG and CCAP collections. The construction of the phylogenetic tree (**Figure 2**) indicates a clustering according to the samples previous lineage assignments or reference. The 18S rDNA

sequences of isolated microalgae strains are deposited in the NCBI database, and the accession numbers are listed in **Table 1**. The reference and environmental microalgae strains cluster with the reference Chlorophyta strains, nearest relatives obtainable from popular culture collections can be deduced from the phylogenetic tree shown in **Figure 2**. For enhanced strain validation and culture status, we determined the fatty acid profile (**Table 2**). All isolated and deposited microalgae samples showed similar fatty acid profiles as reference data (Lang et al., 2011). The red algae *P. purpureum* showed a previously observed 41.9% eicosatetraenoic acid content in total transesterified lipid extracts.

Consistently, high folate contents were detected in all algae biomasses samples, in the range between $539 \pm 150 \mu\text{g}/100 \text{g}$ and $6,470 \pm 167 \mu\text{g}/100 \text{g}$. The commercial reference food

supplements showed high folate contents of $1,690 \pm 17.3 \mu\text{g}/100 \text{g}$ (Supplement 1) and $2,450 \pm 52.1 \mu\text{g}/100 \text{g}$ (Supplement 2), respectively. For the cultured reference *Chlorella vulgaris* (SAG211-12) biomass a folate content of $3,460 \pm 134 \mu\text{g}/100 \text{g}$ was detected. The highest overall total folate content was observed in *Picochlorum* sp. isolate with a very high value of $6,470 \pm 167 \mu\text{g}/100 \text{g}$ in dry biomass thus revealing a significantly higher [$p < 0.05, n = 1$ (biological)] total folate content compared to all other samples. The lowest total folate content was observed in *P. purpureum* biomass with a value of $539 \pm 150 \mu\text{g}/100 \text{g}$. The folate contents analyzed in microalgae are graphically shown in **Figure 3** (left), and the detailed values are listed in **Table 3**.

Moreover, we differentially analyzed the main vitamins present in food encompassing PteGlu, H₄folate, 5-CH₃-H₄folate,

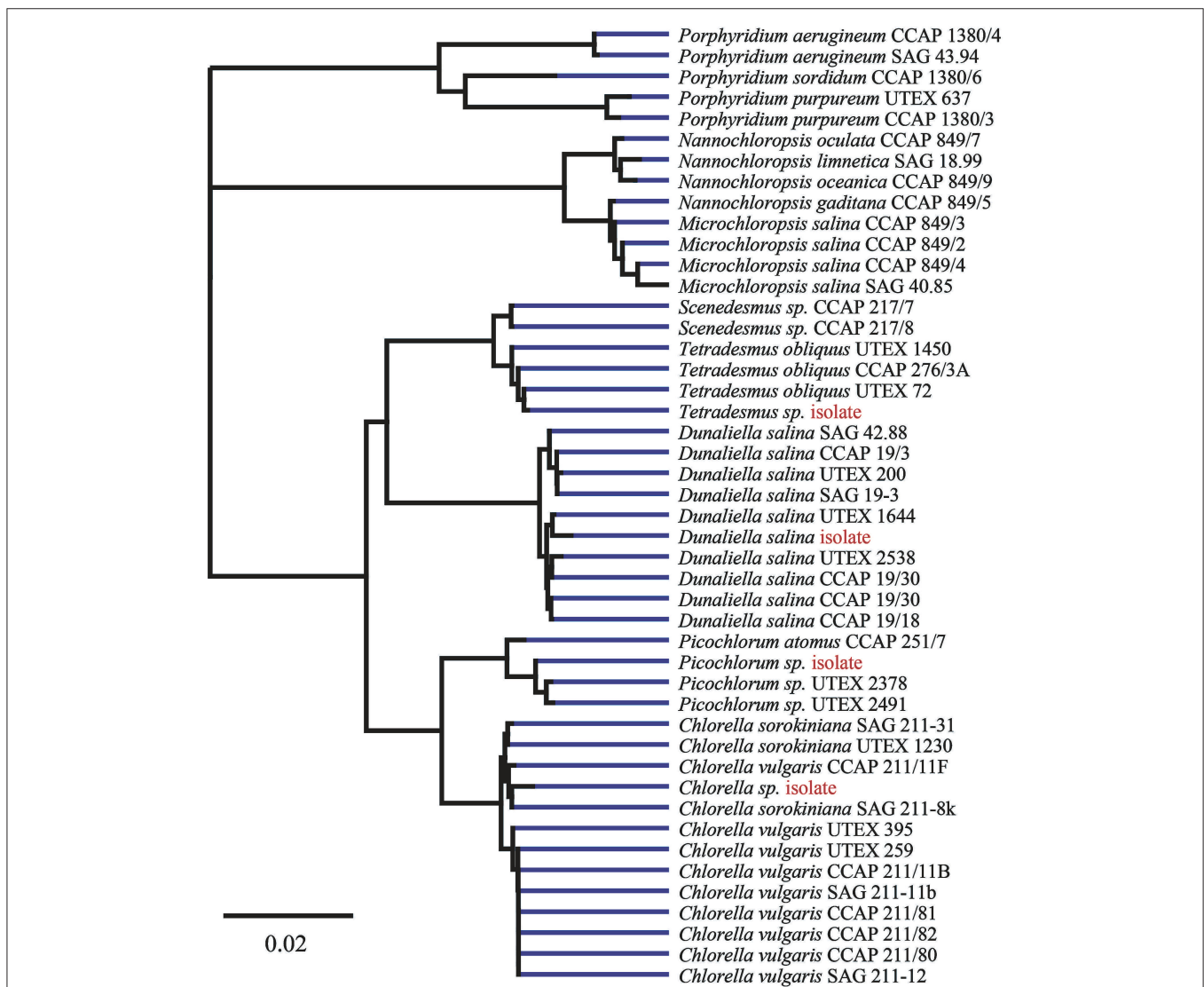
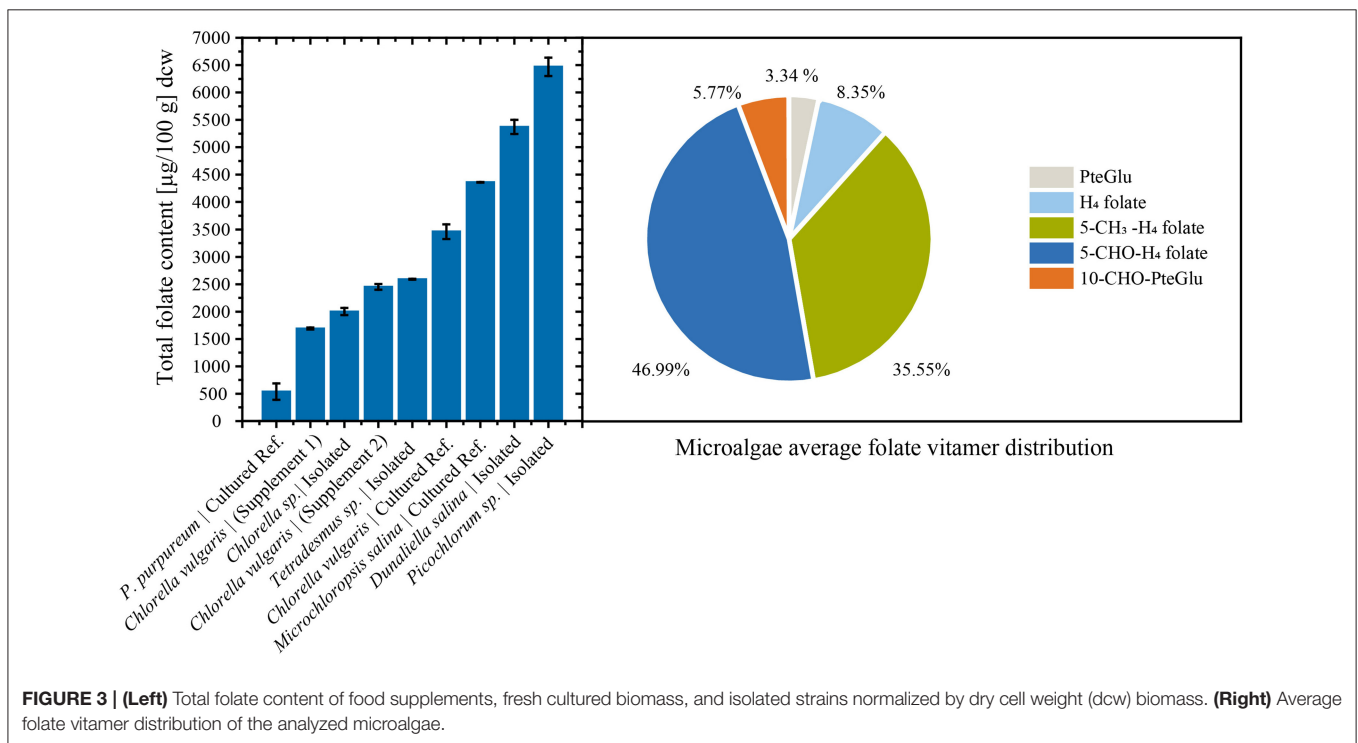


FIGURE 2 | Phylogenetic tree of isolates and reference strains 18S rDNA data build by Geneious Tree Builder [Geneious 11.1.3 (https://www.geneious.com)]. Visualization of global alignment and Neighbor-Joining with 93% similarity cost matrix using the Tamura-Nei distance model.

TABLE 2 | Fatty acid composition of microalgae samples by GC-FID analysis.

Fatty acid methyl esters (FAME) [%]	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:4	C20:5	18S rDNA accession number
CULTURED REFERENCE STRAINS										
<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12	24.2	9.1	Trace	5.7	Trace	25.1	34.6	ND	ND	MK971791
<i>Porphyridium purpureum</i> CCAP 1380/3	26.8	Trace	Trace	2.6	Trace	16.8	ND	41.9	8.9	MK971789
<i>Microchloropsis salina</i> SAG 40.85	34.1	5.7	Trace	8.7	Trace	40.7	7.6	ND	ND	MK971790
ISOLATED STRAINS										
<i>Picochlorum</i> sp. isolate	35.9	Trace	1.7	16.8	Trace	23.1	19.5	ND	ND	MK973100
<i>Dunaliella salina</i> isolate	23.0	9.3	1.0	7.8	1.6	25.3	30.1	ND	ND	MK973098
<i>Tetradesmus</i> sp. isolate	31.4	1.0	Trace	26.1	1.1	23.0	13.2	ND	ND	MK973099
<i>Chlorella</i> sp. isolate	24.3	Trace	Trace	7.2	1.8	23.4	31.4	ND	ND	MN365023

ND, not detected; Trace <1%.



5-CHO-H₄folate, and 10-CHO-PteGlu. The average vitamers distribution is shown in **Figure 3** (right), and a detailed distribution is listed in **Table 3**. The main vitamers were 5-CH₃-H₄folate (5.43–70.1%) and 5-CHO-H₄folate (18.6–80.9%). The minor vitamers were 10-CHO-PteGlu (1.19–12.6%), H₄folate (0.54–21.2%), and the fully oxidized PteGlu (0.07–13.3%). 5-CH₃-H₄folate was the main vitamer in *Tetradesmus* sp. isolate, *Microchloropsis salina* SAG 40.85, *Chlorella vulgaris* SAG 211-12, and the *Picochlorum* sp. isolate.

Microalgae cultivation often requires product accumulation measures to increase obtainable yields in a technical scale. Particularly, effects of osmotic stress in case of pigment production and nitrogen limitation in case of lipid production are utilized (Borowitzka et al., 1990; Wang et al., 2019). The model microalgae *Chlorella* sp. isolate was used in an additional experiment to evaluate effects of widely applied stressors during late cultivation stages. Osmotic stress for 24h did have a significant negative effect [$p < 0.05$, $n = 3$ (biological)] on

total folates in *Chlorella* sp. isolate (**Figure 4**). Also, nitrogen limitation resulted in reduced [$p < 0.05$, $n = 3$ (biological)] detectable total folate contents. In contrast, light spectrum shift did not show differences on total folate. The detailed values and illumination conditions are shown in **Table S1**.

DISCUSSION

In this study, an analysis of the total folate content of a genetically defined microalgae series with a focus on halophilic Chlorophyta has been carried out. We measured very high total folate contents in all analyzed microalgae samples. The cumulative data indicate that microalgae can serve as a concentrated source of natural folates in form of food supplement products for folate-deficient populations. However, the set of analyzed microalgae species showed high variations in total folate, giving room for process and strain optimization toward concentrated algae

TABLE 3 | The folate content and vitamer distribution of selected microalgae strains, calculated as PteGlu in [$\mu\text{g}/100\text{g}$].

Genus; species; strain	5-CH ₃ -H ₄ folate	5-CHO-H ₄ folate	10-CHO-PteGlu	H ₄ folate	PteGlu	Total folate content
COMMERCIAL FOOD SUPPLEMENTS						
<i>Chlorella vulgaris</i> (Supplement 1)	397 ± 11.6	1010 ± 17.3	119 ± 1.81	60.6 ± 6.41	108 ± 7.86	1690 ± 17.3
<i>Chlorella vulgaris</i> (Supplement 2)	631 ± 82.7	1510 ± 65.8	132 ± 7.58	102 ± 17.9	73.3 ± 2.53	2450 ± 52.1
CULTURED REFERENCE STRAINS						
<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12	2420 ± 47.8	643 ± 4.29	168 ± 83.9	216 ± 13.6	7.96 ± 3.88	3460 ± 134
<i>Porphyridium purpureum</i> CCAP 1380/3	191 ± 40.3	137 ± 28.4	67.7 ± 75.0	71.0 ± 28.4	71.5 ± 4.74	539 ± 150
<i>Microchloropsis salina</i> SAG 40.85	3050 ± 50.0	1060 ± 50.0	77.2 ± 4.55	147 ± 2.50	23.2 ± 1.45	4360 ± 5.60
CULTURED ISOLATED STRAINS						
<i>Picochlorum</i> sp. isolate	4020 ± 8.87	1990 ± 124	76.9 ± 10.8	285 ± 73.0	96.4 ± 22.1	6470 ± 167
<i>Dunaliella salina</i> isolate	847 ± 33.7	3960 ± 48.0	255 ± 28.6	269 ± 43.3	39.8 ± 23.5	5370 ± 129
<i>Tetradesmus</i> sp. isolate	1410 ± 8.62	731 ± 14.5	82.3 ± 1.48	306 ± 4.54	67.0 ± 0.68	2590 ± 9.59
<i>Chlorella</i> sp. isolate	718 ± 99.9	832 ± 82.3	38.6 ± 4.93	407 ± 40.3	1.40 ± 0.70	2000 ± 66.6

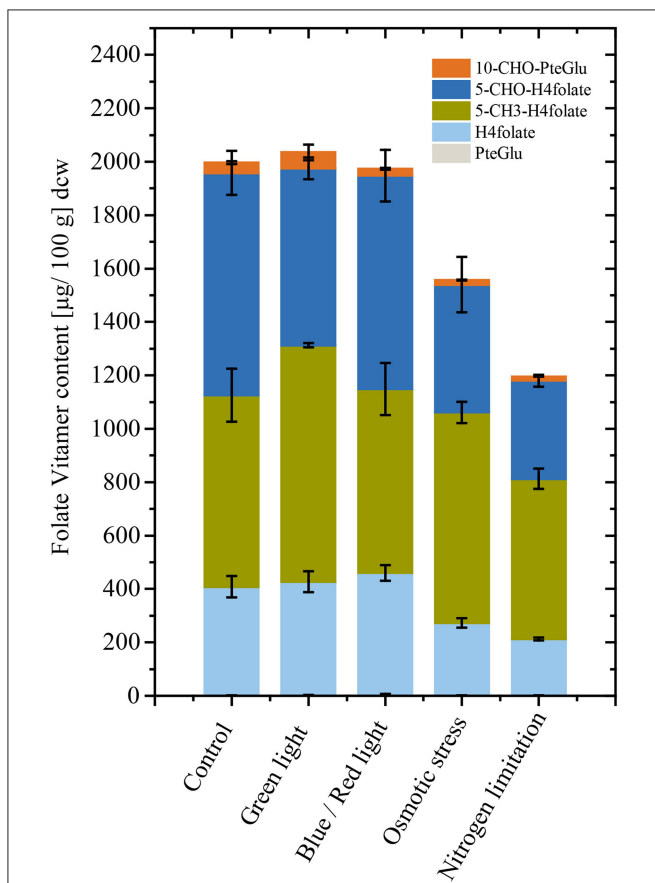


FIGURE 4 | Total folate content and vitamer distribution after conditional changes applied for 24 h in triplicates. *Chlorella* sp. isolate cultivations show reduced folate content when exhibited to osmotic stress and nitrogen limitation. Light wavelength changes did not affect folate contents when shifted for 24 h.

relatively high folate content, which however was only half of the total amount detected in cultured *Chlorella vulgaris*. *Chlorella* biomass has gained industrial attention in the past due to their generally regarded as safe (GRAS) status declared by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). This GRAS status renders novel food approval of these products unnecessary and allows a rapid market rollout of these products. While our isolated halophilic algae strains *Dunaliella* sp. and *Picochlorum* sp. displayed significantly higher folate yields than *Chlorella*, the regulatory barriers for novel food would delay their market entry despite their excellent nutritional content. What is more, the biomass of the *Picochlorum* sp. isolate showed a total folate content of 6,470 $\mu\text{g}/100\text{g}$, which is currently the highest total folate content detected in algae. This results further emphasizes the importance of halophilic microalgae as an excellent source of micronutrients. Previous publications reported total folate contents within the same order of magnitude as our results. Brown et al. analyzed the vitamin content of four Australian microalgae, inter alia *Nannochloropsis* sp., *Pavlova pinguis*, *Stichococcus* sp., and *Tetraselmis* sp. (Brown et al., 1999). The latter authors detected folate concentrations ranging between 1,700 and 2,600 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Microalgae collected in Japanese ponds were found to contain total folate contents in a range between 1,500 and 3,600 $\mu\text{g}/100\text{g}$ in dry biomass (Fujii et al., 2010). As previous studies applied microbiological assays to determine the folate content, they were not able to determine the folate pattern. Recently, Edelmann et al. analyzed various commercially available microalgae powder using microbiological assays and an UHPLC methods to differentiate between different vitamers (Edelmann et al., 2019). The group found in average significantly higher total folate contents in *Chlorella* (2,500–4,700 $\mu\text{g}/100\text{g}$) and *Nannochloropsis gaditana* (2,080 $\mu\text{g}/100\text{g}$) compared to *Spirulina* (250–470 $\mu\text{g}/100\text{g}$). The reviewed amounts of *Chlorella* agree with the folate contents in this study.

Furthermore, we found 5-CH₃-H₄folate and 5-CHO-H₄folate as the main vitamers in all algae isolates studied, which is in accordance with Edelmann et al. (2019). The latter authors also quantified 5,10-CH⁺-H₄folate and found not negligible amounts of this vitamer in *Spirulina* samples. This vitamer should be

included in future analysis of microalgae. As previous studies applied microbiological assays or UHPLC methods to determine the folate content, this is the first report of the folate vitamers distribution in microalgae by high-resolution mass spectrometry. As folate vitamers show different stabilities and conversion reactions, the folate pattern can give additional information about the stability of folates in microalgae.

The absorption capacity, as well as the post-absorptive metabolism of different vitamers, lacks deeper understanding (Visentin et al., 2014). However, due to the different stability of folate vitamers, we assume that H₄folate is less bioavailable (Ringling and Rychlik, 2017b). Furthermore, to shed light on the extend of absorption of folates from algae, human trials are required. In the context of species-specific folate concentrations our results for the *Dunaliella* genus exceeded previously reported values (*Dunaliella tertiolecta*, 480 µg/100 g dry biomass) by the factor of ten. In this context it remains to be demonstrated, whether this discrepancy is due to physiological and phenotypic states of the algae or based on subspecies genetic variations.

High folate and vitamin concentration in microalgae biomass is not a generality (Croft et al., 2006); and we observed significantly lower folate content in the studied red algae *P. purpureum*. Osmotic stress and nitrogen limitation during cultivation showed negative effects on total folate content in *Chlorella* sp. As far as we know, this is the first report of precise stress effects during microalgae cultivations, indicating that nitrogen starvation and increased salinity impacts on total

folate content negatively in *Chlorella* sp. This is particularly interesting for cultivation processes of microalgae biomass for food and feed. Typical valorization concepts for marine algae biomass includes multiple product streams, and relies on lipid and pigment accumulation, which seems at least in the model algae *Chlorella* sp. to be unfavorable for folate production. Also, *Dunaliella* sp. isolates showed a reduced total folate content when samples were analyzed from the stationary cultures (data not shown). However, only limited and contradictory results on folate accumulation under differential growth conditions are documented (Brown et al., 1999). Folate synthesis is associated with assimilation processes, thus we postulate that highest folate concentrations will be found under unlimited growth conditions (Hjortmo et al., 2008). Further studies are needed to shed light on the underlying metabolic regulation of folates in freshwater and marine microalgae. Product stability is a major concern as degradation of folates is known (Fitzpatrick et al., 2012; Blancquaert et al., 2015) rendering supplement product formulation, packaging, and distribution similar decisive as developments in process and strain optimization (Blancquaert et al., 2015).

Figure 5 depicts a summary of previously analyzed foods and supplements, presented in comparison with our results. In order to reach the European RDA of 300 µg or United States RDA of 400 µg (Krawinkel et al., 2014), an intake of only 6 g *Picochlorum* sp. dry biomass would be required. In contrast, reaching the RDA with high folate content fruits as strawberries

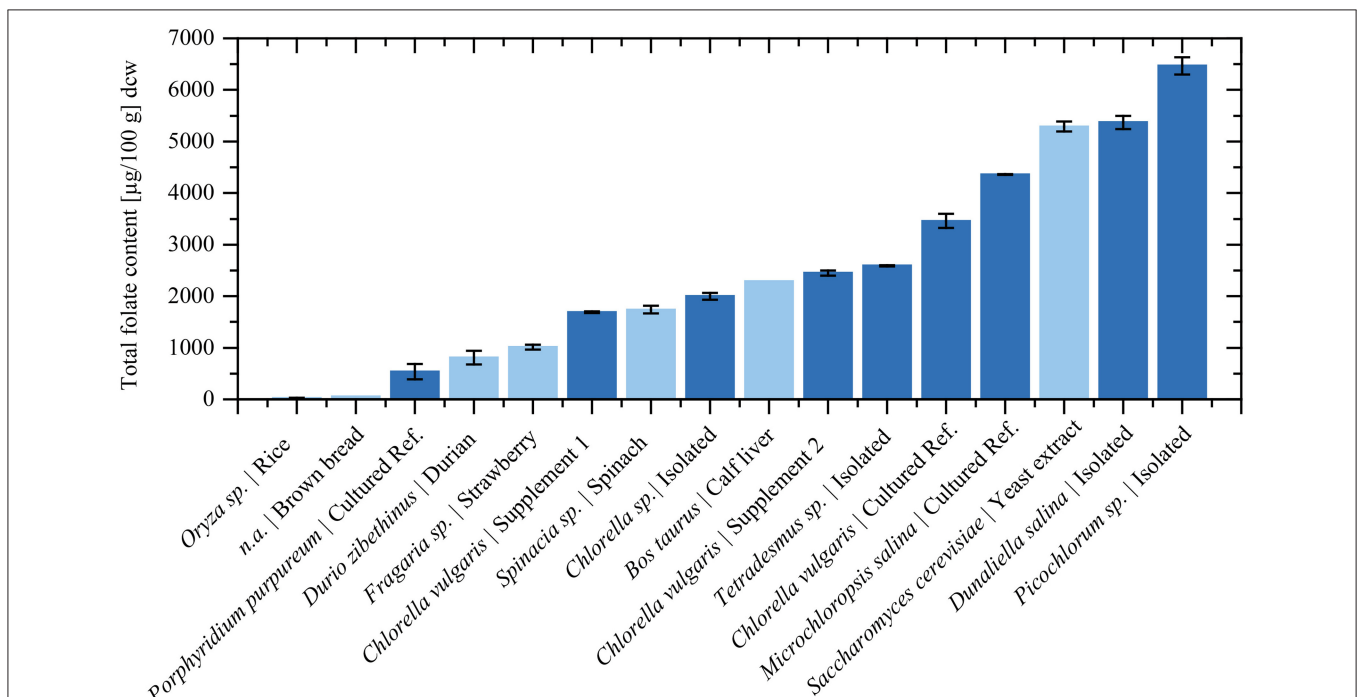
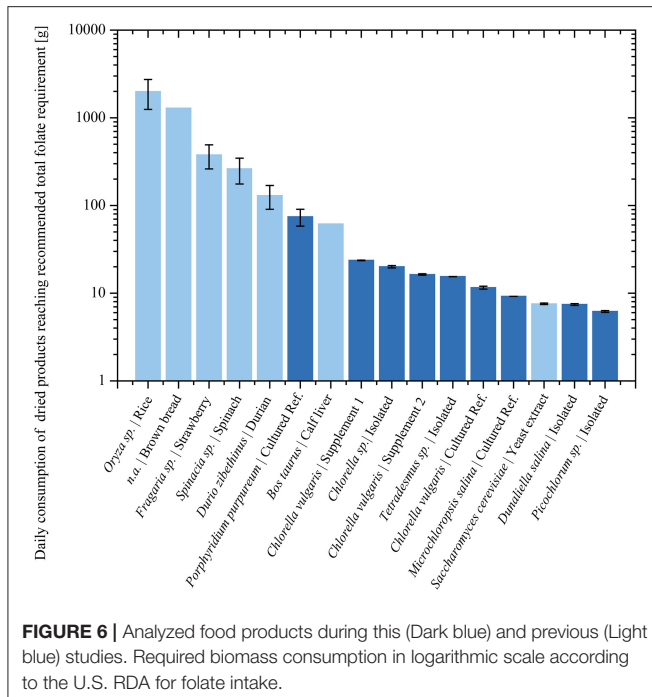


FIGURE 5 | The total folate content in selected food and algae dry biomass. Dark blue bars represent measured values from this study. The total folate content of food products was taken from previous publications using the same quantification method. The total folate contents were adapted to dry biomass according to literature values (Souci et al., 2008): Rice (*Oryza* sp.) from Ringling and Rychlik (2017a), Strawberry (*Fragaria* sp.) from Striegel et al. (2018b), Brown bread from Ringling and Rychlik (2013), Spinach (*Spinacia* sp.) (Ringling and Rychlik, 2013), Durian (*Durio zibethinus*) from Striegel et al. (2018a), Calf liver from Ringling and Rychlik (2017a), Yeast extract from Jacob et al. (2019).



would require about 400 g dried biomass (Figure 6). Thus, it is viable to flag algae as concentrated food and nutrient producing platforms. To the best of our knowledge, we are the first to report the folate content of different microalgae strains using SIDA as quantification method. Microalgae, the potentially highest source of folates, warrant further studies on the distribution of pteroylpolyglutamates as well as on bioaccessibility, absorption, and retention for physiological functions.

REFERENCES

- Allen, E. J., and Nelson, E. W. (1910). On the artificial culture of marine plankton organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 8:421. doi: 10.1017/S0025315400073690
- Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4, 1–4. doi: 10.1111/j.1529-8817.1968.tb04667.x
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anderson, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques, 1st Edn.* Burlington, MA; San Diego, CA; London: Elsevier Academic Press.
- Apel, A. C., and Weuster-Botz, D. (2015). Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 995–1008. doi: 10.1007/s00449-015-1363-1
- Asam, S., Konitzer, K., Schieberle, P., and Rychlik, M. (2009). Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5152–5160. doi: 10.1021/jf900450w
- Becker, W. (2003). "Microalgae in human and animal nutrition," in *Handbook of Microalgal Culture*, eds A. Richmond and Q. Hu (Oxford: Blackwell Publishing Ltd.), 312–351.
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., and Dall'Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb. Cell Fact.* 17:173. doi: 10.1186/s12934-018-1019-3
- Bischoff, H. W., and Bold, H. C. (1963). *Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species.* Austin, TX: University of Michigan; University of Texas.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Generated sequencing reads can be found at NCBI database: MK971789, MK971790, MK971791, MK973100, MK973098, MK973099, MN365023.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS, TF, and DW conceived the experiment, analyzed the data, and co-wrote the manuscript. LS, TF, DW, and NW performed experiments. MF reviewed writing. TB and MR supervised the project and reviewed writing.

FUNDING

This work was supported by the German Research Foundation (DFG), the Bavarian Ministry of Economic Affairs, Energy and Technology (20E1507A), the Federal Ministry of Education and Research (033RC012B), and the Technical University of Munich (TUM) in the framework of the Open Access Publishing Program.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Soraya Chebib and Caroline Dumler for their contribution in the lab.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00481/full#supplementary-material>

- Blancquaert, D., Van Daele, J., Strobbe, S., Kiekens, F., Storozhenko, S., De Steur, H., et al. (2015). Improving folate (vitamin B9) stability in biofortified rice through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol.* 33, 1076–1078. doi: 10.1038/nbt.3358
- Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-Algal Biotechnology.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., and Kessly, D. (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 2, 111–119. doi: 10.1007/BF00023372
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., and Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 11, 247–255. doi: 10.1023/A:1008075903578
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., and Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62, 794–799. doi: 10.3109/09637486.2011.582460
- Croft, M. T., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryot. Cell* 5, 1175–1183. doi: 10.1128/EC.00097-06
- Delchier, N., Herbig, A.-L., Rychlik, M., and Renard, C. M. G. C. (2016). Folate in fruits and vegetables: contents, processing, and stability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 506–528. doi: 10.1111/1541-4337.12193
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L. B., Roy, A., and Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 169–177. doi: 10.1016/j.copbio.2012.09.012
- Edelmann, M., Aalto, S., Chamlagain, B., Kariluoto, S., and Piironen, V. (2019). Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders. *J. Food Compos. Anal.* 82:103226. doi: 10.1016/j.jfca.2019.05.009

- Fitzpatrick, T. B., Basset, G. J. C., Borel, P., Carrari, F., DellaPenna, D., Fraser, P. D., et al. (2012). Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? *Plant Cell Online* 24, 395–414. doi: 10.1105/tpc.111.093120
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342. doi: 10.1038/nature10452
- Fujii, K., Nakashima, H., and Hashidzume, Y. (2010). Isolation of folate-producing microalgae, from oligotrophic ponds in Yamaguchi, Japan. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1421–1429. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04542.x
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., and Harrison, S. T. L. (2010). Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids* 45, 1053–1060. doi: 10.1007/s11745-010-3468-2
- Grosso, G., Pajak, A., Marventano, S., Castellano, S., Galvano, F., Bucolo, C., et al. (2014). Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS ONE* 9:e96905. doi: 10.1371/journal.pone.0096905
- Hanson, A. D., and Gregory, J. F. (2002). Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 244–249. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00249-2
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., and Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1037–1047. doi: 10.1016/j.rser.2009.11.004
- Hjortmo, S., Patring, J., and Andlid, T. (2008). Growth rate and medium composition strongly affect folate content in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 93–100. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.004
- Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., and Methner, F.-J. (2019). Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture: influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance. *Eur. Food Res. Technol.* 245, 1–14. doi: 10.1007/s00217-019-03237-9
- Kay, R. A., and Barton, L. L. (1991). Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 555–573. doi: 10.1080/10408399109527556
- Kent, M., Welladsen, H. M., Mangot, A., and Li, Y. (2015). Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS ONE* 10:e0118985. doi: 10.1371/journal.pone.0118985
- Krawinkel, M. B., Strohm, D., Weissenborn, A., Watzl, B., Eichholzer, M., Bärlocher, K., et al. (2014). Revised D-A-CH intake recommendations for folate: how much is needed? *Eur. J. Clin. Nutr.* 68, 719–723. doi: 10.1038/ejcn.2014.45
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., and Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol.* 11:124. doi: 10.1186/1471-2229-11-124
- Laurens, L. M. L., Markham, J., Templeton, D. W., Christensen, E. D., Van Wychen, S., Vadelius, E. W., et al. (2017). Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy Environ. Sci.* 10, 1716–1738. doi: 10.1039/C7EE01306j
- Lipper, L., Thornton, P., Campbell, B. M., Baedeker, T., Braimoh, A., Bwalya, M., et al. (2014). Climate-smart agriculture for food security. *Nat. Clim. Chang.* 4, 1068–1072. doi: 10.1038/nclimate2437
- Marventano, S., Kolacz, P., Castellano, S., Galvano, F., Buscemi, S., Mistretta, A., et al. (2015). A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 611–622. doi: 10.3109/09637486.2015.1077790
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., and Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71, 491–499. doi: 10.1016/0378-1119(88)90066-2
- Pratt, R., and Johnson, E. (1965). Production of thiamine, riboflavin, folic acid, and biotin by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Pharm. Sci.* 54, 871–874. doi: 10.1002/jps.2600540611
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A., and Droop, M. R. (1957). The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25, 392–428. doi: 10.1007/BF00446694
- Pulz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648. doi: 10.1007/s00253-004-1647-x
- Ringling, C., and Rychlik, M. (2013). Analysis of seven folates in food by LC-MS/MS to improve accuracy of total folate data. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 17–28. doi: 10.1007/s00217-012-1849-x
- Ringling, C., and Rychlik, M. (2017a). Origins of the difference between food folate analysis results obtained by LC-MS/MS and microbiological assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1815–1825. doi: 10.1007/s00216-016-0126-4
- Ringling, C., and Rychlik, M. (2017b). Simulation of food folate digestion and bioavailability of an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate. *Nutrients* 9, 1–19. doi: 10.3390/nu9090969
- Rothschild, L. J., and Mancinelli, R. L. (2011). Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. doi: 10.1038/35059215
- Rychlik, M. (ed). (2011). *Fortified Foods With Vitamins*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., et al. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bio Energy Res.* 1, 20–43. doi: 10.1007/s12155-008-9008-8
- Selhub, J. (2002). Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J. Nutr. Health Aging* 6, 39–42.
- Shane, B. (1989). Polyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam. Horm.* 45, 263–335. doi: 10.1016/S0083-6729(08)60397-0
- Sheppard, P., Garcia-Garcia, G., Angelis-Dimakis, A., Campbell, G. M., and Rahimifard, S. (2019). Synergies in the co-location of food manufacturing and biorefining. *Food Bioprod. Process.* 117, 340–359. doi: 10.1016/j.fbp.2019.08.001
- Souci, S. W., Siegfried W., Fachmann, W., Kraut, H., Kirchoff, E., Germany Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, et al. (2008). *Food Composition and Nutrition Tables*. Stuttgart: MedPharm Scientific Publishers.
- Striegel, L., Chebib, S., Dumler, C., Lu, Y., Huang, D., and Rychlik, M. (2018a). Durian fruits discovered as superior folate sources. *Front. Nutr.* 5:114. doi: 10.3389/fnut.2018.00114
- Striegel, L., Chebib, S., Netzel, M. E., and Rychlik, M. (2018b). Improved stable isotope dilution assay for dietary folates using LC-MS/MS and its application to strawberries. *Front. Chem.* 6:11. doi: 10.3389/fchem.2018.00011
- Subhadra, B., and Grinson-George (2011). Algal biorefinery-based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2–13. doi: 10.1002/jsfa.4207
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., and Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. doi: 10.1038/nature01014
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., et al. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292, 281–284. doi: 10.1126/science.1057544
- van der Spiegel, M., Noordam, M. Y., and van der Fels-Klerx, H. J. (2013). Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 662–678. doi: 10.1111/1541-4337.12032
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., and Eppink, M. H. M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.* 135, 142–149. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.135
- Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., and Goldman, I. D. (2014). The intestinal absorption of folates. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 251–274. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153251
- Wang, X., Fosse, H. K., Li, K., Chauton, M. S., Vadstein, O., and Reitan, K. I. (2019). Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed. *Front. Mar. Sci.* 6:95. doi: 10.3389/fmars.2019.00095
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., et al. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* 29, 949–982. doi: 10.1007/s10811-016-0974-5

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Woortman, Fuchs, Striegel, Fuchs, Weber, Brück and Rychlik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Identifying carbohydrate-active enzymes of
Cutaneotrichosporon oleaginosus using
systems biology**

RESEARCH

Open Access



Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology

Tobias Fuchs, Felix Melcher, Zora Selina Rerop, Jan Lorenzen, Pariya Shaigani, Dania Awad, Martina Haack, Sophia Alice Prem, Mahmoud Masri, Norbert Mehlmer* and Thomas B. Brueck*

Abstract

Background: The oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus* represents one of the most promising microbial platforms for resource-efficient and scalable lipid production, with the capacity to accept a wide range of carbohydrates encapsulated in complex biomass waste or lignocellulosic hydrolysates. Currently, data related to molecular aspects of the metabolic utilisation of oligomeric carbohydrates are sparse. In addition, comprehensive proteomic information for *C. oleaginosus* focusing on carbohydrate metabolism is not available.

Results: In this study, we conducted a systematic analysis of carbohydrate intake and utilisation by *C. oleaginosus* and investigated the influence of different di- and trisaccharide as carbon sources. Changes in the cellular growth and morphology could be observed, depending on the selected carbon source. The greatest changes in morphology were observed in media containing trehalose. A comprehensive proteomic analysis of secreted, cell wall-associated, and cytoplasmatic proteins was performed, which highlighted differences in the composition and quantity of secreted proteins, when grown on different disaccharides. Based on the proteomic data, we performed a relative quantitative analysis of the identified proteins (using glucose as the reference carbon source) and observed carbohydrate-specific protein distributions. When using cellobiose or lactose as the carbon source, we detected three- and five-fold higher diversity in terms of the respective hydrolases released. Furthermore, the analysis of the secreted enzymes enabled identification of the motif with the consensus sequence LALL[LA]L[LA][LA]AAAAAAA as a potential signal peptide.

Conclusions: Relative quantification of spectral intensities from crude proteomic datasets enabled the identification of new enzymes and provided new insights into protein secretion, as well as the molecular mechanisms of carbohydrate hydrolases involved in the cleavage of the selected carbon oligomers. These insights can help unlock new substrate sources for *C. oleaginosus*, such as low-cost by-products containing difficult to utilize carbohydrates. In addition, information regarding the carbo-hydrolytic potential of *C. oleaginosus* facilitates a more precise engineering approach when using targeted genetic approaches. This information could be used to find new and more cost-effective carbon sources for microbial lipid production by the oleaginous yeast *C. oleaginosus*.

Keywords: *Cutaneotrichosporon oleaginosus*, Carbohydrate metabolism, Carbohydrate uptake, Proteomics, Protein secretion

Background

The oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus* (*C. oleaginosus*, ATCC20509, *Agaricomycotina*) is currently the most promising microorganism for

*Correspondence: norbert.mehlmer@tum.de; brueck@tum.de
Werner Siemens-Chair of Synthetic Biotechnology (WSSB), Technical University of Munich, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching, Germany



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

resource-efficient microbial lipid production, that can accumulate high contents of intracellular lipids (up to 87% w/ d.c.w.), using sustainable and inexpensive carbon sources [1]. The genus *Cutaneotrichosporon* belongs to the Basidiomycota family [2]. Usually, glucose is the preferred carbohydrate source of most microorganisms [3]. However, *C. oleaginosus* can metabolise various carbon sources in parallel (including pentoses) without catabolic repression [4]. In particular, *C. oleaginosus* features an increased capacity for metabolising diverse and chemically complex carbon sources, including most mono-, di-, and trimeric sugars, as well as glycerol, volatile fatty acids, and lignin-derived aromatics [4–6]. This unique attribute provides *C. oleaginosus* with the metabolic capacity to utilise complex biomass hydrolysates derived from various biomass sources, such as lignocellulose and crude glycerol derived from biodiesel processing, without the need for detoxification. Such biomass sources have been shown to contain well-established fermentation inhibitors, such as acetic acid, furfural, and methanol [1, 7, 8]. The wide acceptance and parallel use of different carbon sources enables the efficient metabolism of complex substrates obtained from biological waste streams, including macroalgal residues [9–11]. Interestingly, toxic substances have only a minor impact on the growth of this yeast, which indicates it employs rapid adaptation mechanisms. Thus, *C. oleaginosus* can tolerate and even metabolically utilise high concentrations of acetic acid, which is not the case for the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Currently, the molecular mechanisms enabling *C. oleaginosus* to metabolise an extremely broad range of carbon sources, including various oligosaccharides, are unknown. Commonly, yeast cells can absorb relatively small, monomeric carbohydrate molecules through specific membrane-associated transporters [12, 13]. Thus, high-molecular-weight carbohydrates (i.e., oligosaccharides and polysaccharides, such as maltose and cellulose) cannot be directly utilised, as they must initially be cleaved to yield fermentable monomeric glucose [14]. The utilisation of complex carbohydrates requires their extracellular degradation by hydrolytic enzyme components, which generate sugar monomers that can be imported into yeast cells and metabolically utilised [15]. Alternatively, filamentous fungi, such as *Trichoderma reesei*, are known to secrete large amounts of hydrolytic enzymes into the surrounding environment, which enable the hydrolysis and subsequent metabolic utilisation of remote, chemically complex polymeric carbon sources [16, 17]. In other cases, cell-associated hydrolytic enzymes are found on the surface of bacterial microorganisms (such as *Clostridium thermocellum*) and organised as a cellulosome [14, 18]. Due to the short distance

between the cell-associated hydrolytic complex and the substrate, the high concentrations of released monomers facilitate enhanced absorption by the host. In addition, the intracellular processing of these mobilised carbohydrates by specific enzymes is required for their metabolic utilisation. Although the metabolic routes for carbohydrate uptake and consumption have been described for model yeasts such as *S. cerevisiae* and *Pichia pastoris*, no equivalent data are available for *C. oleaginosus* [19–21].

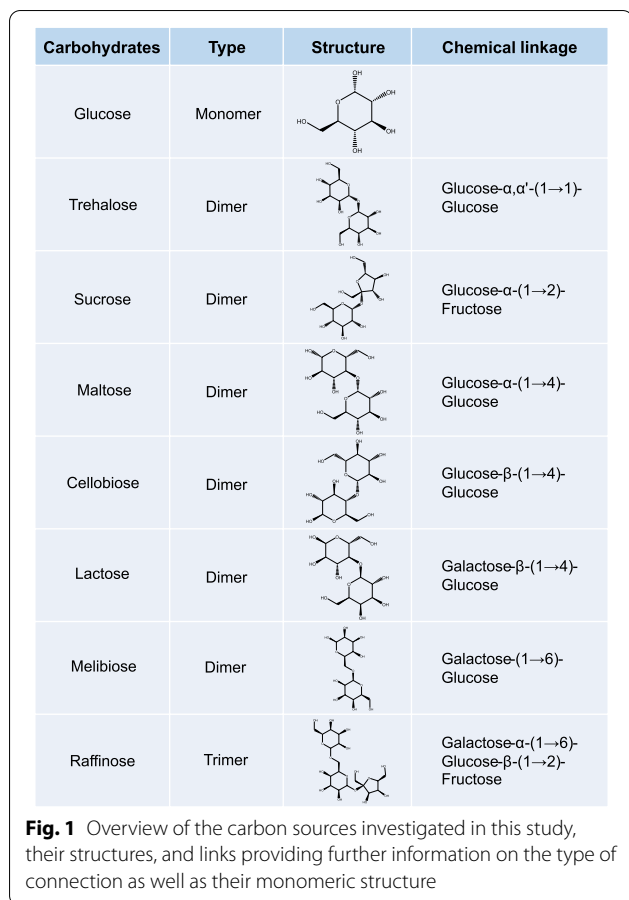
Presently, the metabolism and processing of oligomeric carbohydrates are well described for many organisms [3, 22]; however, neither comprehensive nor systematic data are available for *C. oleaginosus*. The oligomeric sugars selected in this study, are common carbohydrates comprising glucose, galactose, and fructose. All sugars are commercially available or can be released from the hydrolytic processing of lignocellulosic sources [23].

For example, cellobiose and sucrose can be obtained from hydrolysis of wood residues and molasses distillation, respectively [24, 25]. Maltose, in contrast, can be obtained from starch-containing products, such as potato, barley and cassava, while lactose is a constituent of milk whey [26, 27]. As a first step towards elucidating the biochemical and regulatory pathways underlying the metabolic utilisation of di- and trimeric carbohydrates in *C. oleaginosus*, a series of glucose epimers with different linkages (Fig. 1) were used as the sole carbon source for culturing *C. oleaginosus*. The data were complemented with a systematic morphological and proteome analysis. Initially, the *C. oleaginosus* growth rate and morphology were assessed based on the featured disaccharides. Subsequently, a comprehensive proteomic analysis of secreted membrane protein fractions, cell wall-associated protein fractions, and cytoplasmic protein fractions was carried out. A comparative analysis of the generated liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) data revealed significant differences ($p \leq 0.05$) between samples cultured in media containing the selected disaccharides, when compared to glucose controls. In addition, specific signal peptides for the secretion of hydrolytic proteins into the surrounding environment were identified, which represent potential targets for metabolic-engineering approaches.

Results and discussion

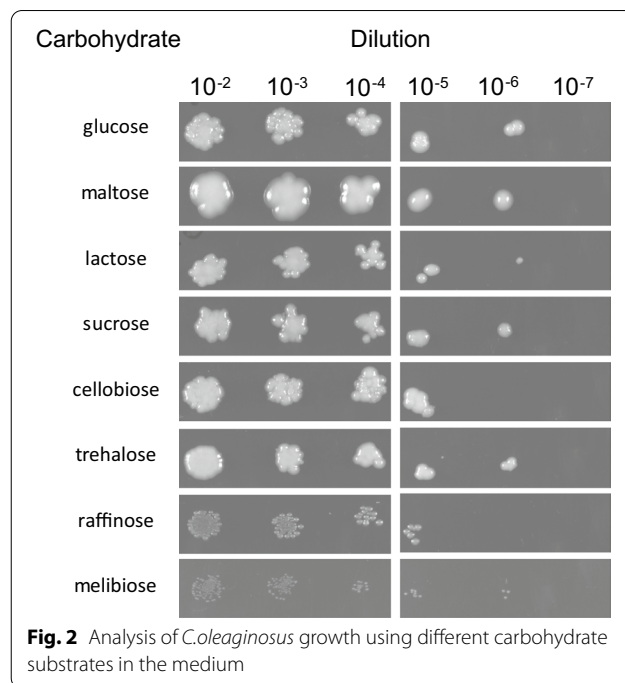
Evaluation of different carbohydrate effects on cellular growth, morphology and lipid formation as well as fatty acid distribution

The ability to assimilate extracellular carbohydrates is of crucial importance for most heterotrophic microorganisms. However, the cellular-uptake capacity and preference for certain carbohydrates depend on the natural habitat of the microorganism of interest and the



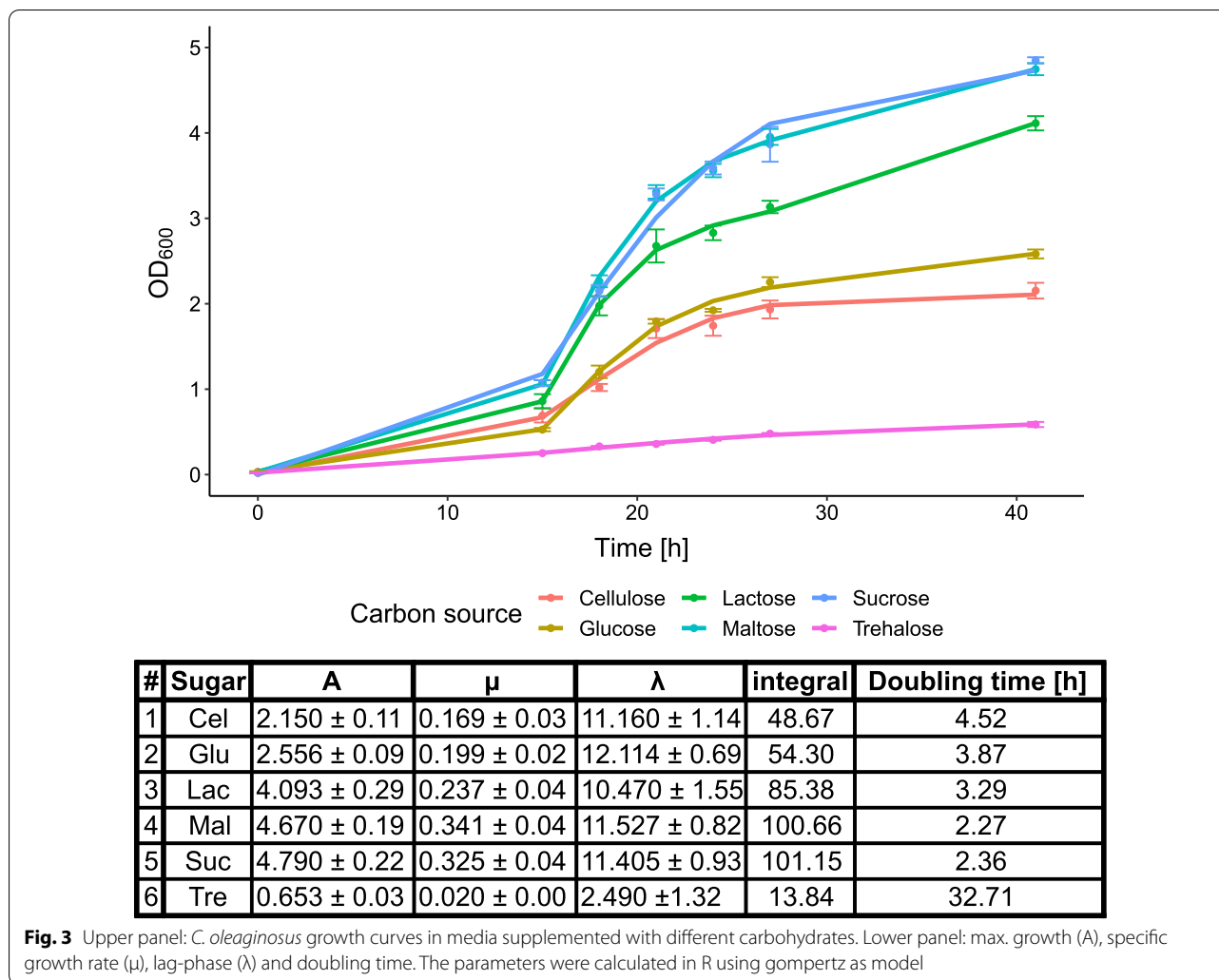
prevailing environmental conditions. In complex carbohydrate mixtures such as biomass hydrolysates, the preferred carbohydrate is usually consumed first, whereas the metabolism of the other available carbohydrates is catabolically repressed [28]. Nevertheless, specific microorganisms, including *C. oleaginosus*, can explicitly metabolise different monomeric carbohydrates in parallel [28]. In contrast to the metabolic utilisation of monomeric carbohydrates, the use of oligomers as a carbon source has received little attention in the literature [4]. To gain insight into the metabolic mechanisms of carbohydrate oligomer utilisation, we conducted a comprehensive study to evaluate the growth kinetics, morphological changes, and enzyme-expression patterns of *C. oleaginosus* cells.

Initially, *C. oleaginosus* cells were cultured on yeast nitrogen base (YNB) plates containing a set of different carbohydrates. The tested carbohydrates included glucose, maltose, lactose, sucrose, cellobiose, trehalose, raffinose, and melibiose. After two days, visible growth was observed for most carbohydrates at dilutions ranging between 10^{-2} and 10^{-6} . Minimal growth was detected in plates containing melibiose and raffinose. Comparing



the phylogeny of *C. oleaginosus* with typical lipid producing yeasts (Additional file 1: Fig. S1), *Trichosporon cutaneum* is the closest relative and in contrast to *C. oleaginosus* is able to metabolise melibiose in liquid medium [2, 29]. Furthermore, *C. oleaginosus* colonies grown on solid media containing maltose were significantly larger than those grown on media containing glucose, lactose, sucrose, cellobiose, or trehalose (Fig. 2).

As the colony size only provides limited information regarding the growth performance, a culture series was carried out in liquid media. The liquid cultures that used raffinose and melibiose as a carbohydrate substrate showed no growth. The growth as well as the specific growth rate, doubling time and lag-phase of *C. oleaginosus* cultures in the presence of the other disaccharides is depicted in Fig. 3. Differences in the growth patterns were visibly detected, depending on the carbohydrate substrate. *C. oleaginosus* cultures in liquid medium showed similar growth curves in the presence of sucrose and maltose. The sucrose and maltose samples reached final optical density at 600 nm (OD_{600}) values of 4.75 and 4.85, which were twice as high as those cultured with glucose and cellobiose, respectively. Previously, other filamentous fungi such as *Mortierella isabellina* grew two times faster on glucose than on sucrose [30]. *C. oleaginosus* in media supplemented with sucrose, maltose, or lactose exhibited similar growth rates, with the latter showing the slowest growth. After 42 h, these cultures showed a final OD_{600} value of 4.11. Although cellobiose cultures grew similarly to the glucose reference cultures,



a slightly reduced growth curve was observed with cultures supplemented with cellobiose, as confirmed by their final OD₆₀₀ values of 2.15 and 2.58, respectively. These results differ from the growth-rate data for *T. cutaneum* described by Mörtberg and colleagues [29]. In contrast to *C. oleagnosus*, *T. cutaneum* grew almost identically in media supplemented with glucose, maltose, lactose, sucrose, cellobiose, or melibiose [29]. However, both strains showed similar decreases in their growth rates when the culture medium was supplemented with trehalose [29].

To examine morphological changes occurring with the yeast cells, the samples were collected during the exponential growth phase. Significant differences in length:width ratio were observed for cultures supplemented with cellobiose, maltose, sucrose, or trehalose compared to those supplemented with glucose (control; Fig. 4 and Additional file 2: Fig. S2). A significant increase in the cell length was observed in cellobiose-supplemented

cultures, whereas the width increased in maltose-supplemented cultures. Furthermore, the cells cultured in media supplemented with sucrose or trehalose showed the biggest differences in the length:width ratio, indicating that an increase in the length occurred. Notably, the cultures supplemented with trehalose displayed a more round- to rod-shaped morphology, compared to that found in cultures supplemented with glucose. In the Basidiomycota, morphological changes are common in the course of sexual reproduction [31, 32]. Furthermore, changes in morphology of yeasts have already been demonstrated in *Yarrowia lipolytica* using N-glycosamine and serum to induce the formation of hyphae [33, 34]. In addition, ambient temperature can affect cell size and morphology on *S. cerevisiae* [35]. Notably, this is the first study describing morphological changes in oleaginous yeasts in response to the supplied carbohydrate source during fermentation. In order to analyse the effects of different carbohydrates on lipid production, lipogenesis

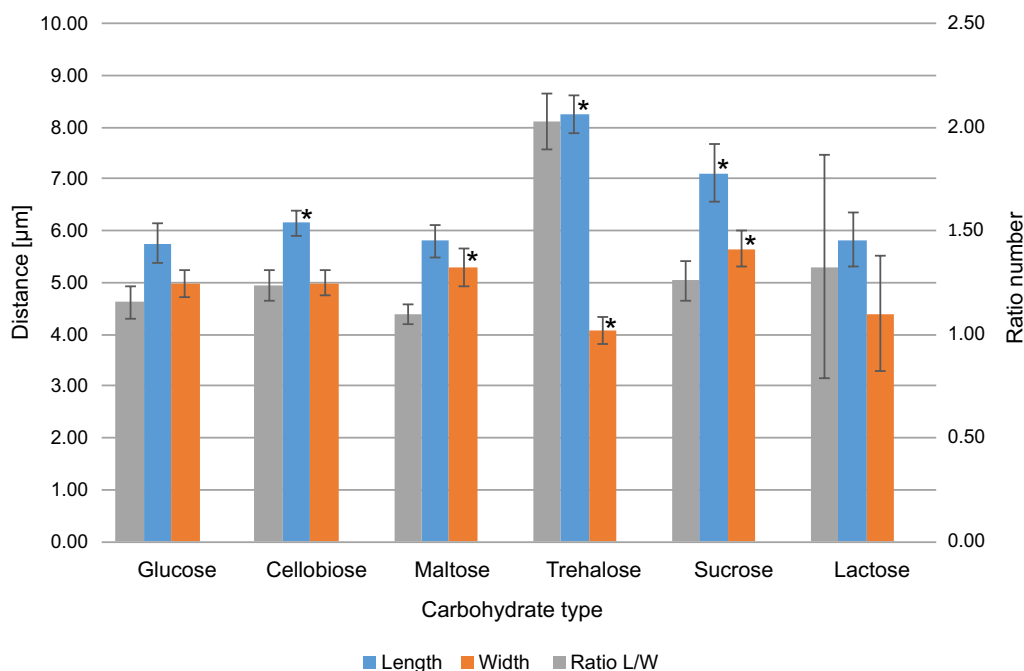


Fig. 4 Morphological variations of *C. oleaginosus* in different culture media. The measured lengths and diameters of the *C. oleaginosus* cells in different cell media are shown. Additionally, the ratio length: width is shown on the secondary axis. The asterisks indicate a significant difference compared to the glucose condition ($p < 0.05$)

in *C. oleaginosus* was induced under nitrogen limiting growth conditions [4]. The distribution of the identified fatty acids, as well as their quantities is shown in Additional file 3: Fig. S3a and b. The lowest fatty acid amount compared to the glucose control was detected in the cultures growing on trehalose with 9.5% (w/dcw, weight/dry cell weight). In contrast, lactose showed the highest fatty acid accumulation with 29.08% (w/dcw). Maltose, cellobiose and sucrose also resulted in elevated fatty acid yields compared to the glucose control (see Additional file 3: Fig. S3a). Furthermore, as described in a previous study, the fatty acid profile (Additional file 3: Fig. S3b) shows that maltose and lactose have a similar fatty acid distribution as the glucose control [4]. However, a slight reduction in oleic acid, as well as an increase in palmitic acid and stearic acid, as described by Awad, could be detected [4]. The most significant influence on the fatty acid profiles could be observed in cultures containing Trehalose. Interestingly, for the Trehalose grown cultures a shift in the proportion of linoleic acid and α -linoleic acid by a factor of 1.58 and 3.12 respectively could be detected with reference to the glucose control. Moreover, the proportion of oleic acid was reduced by a factor of 0.72 compared to the reference culture. At present, there is no biochemical data that could be used to delineate this effect. Currently, detailed metabolomics studies are

underway in our research group to address the required data sets.

Effects of different disaccharides on the distributions of enzyme classes

The effects of different disaccharides on selected protein fractions isolated from the cytoplasm, cell wall, and secretions of *C. oleaginosus* were analysed. The selected carbon sources directly influenced the types and quantities of proteins expressed in *C. oleaginosus*, thus providing information regarding the uptake and metabolism of the respective carbon source.

The high data quantity and quality generated in this study enabled sequence-based analysis of the identified proteins. Initially, overlapping and fraction-specific proteins for the selected carbohydrates were analysed and visualised using Venn diagrams (Additional file 4: Fig. S4). In the secreted fraction of cells cultured in medium supplemented with cellobiose or lactose, the highest numbers of total and carbohydrate-modified proteins were detected. Additionally, an ontology-based classification of the proteins into classes such as biological processes, molecular functions, and cellular components was performed (Additional file 5: Fig. S5. Additional file 6: Fig. S6, Additional file 7: Fig. S7). Within this dataset, an approximately equal distribution of each protein group

was observed, whereas the total number of proteins per group varied.

To functionally analyse the identified proteins expressed under specific carbohydrate conditions and compare them to the reference condition (glucose), a classification of their respective enzyme commission (EC) numbers was performed. The subsequent assignments of each fraction (secreted, cell wall-associated, and cytoplasmic), as well as the respective carbon source, are shown in Fig. 5. The EC numbers did not vary significantly for the cytoplasmic fraction when compared to those of the reference condition (Fig. 5c); however, the EC number distributions of the cell wall-associated enzyme fractions were significantly different when comparing the diverse carbohydrate sources with that of the reference condition (Fig. 5b). The lactose and trehalose datasets indicated a two-fold enhancement in various hydrolase activities (enzyme class 3). Significant differences in the EC numbers were also detected in yeast cultures in medium supplemented with maltose, except for the class of ligases (enzyme class 6).

Interestingly, the distributions of the enzyme classes found in the secretome showed the greatest quantitative differences. This contrasts the situation in the yeast *P. pastoris*, whose secretion profile hardly changed, when cultivated with different carbon sources [36]. As shown in Fig. 5a, a relatively small number of proteins per enzyme class could be detected under the glucose condition (≤ 10 different enzymes per enzyme class). Compared to the glucose condition, significant increases in the diversity of different enzyme classes were detected with all disaccharides investigated. Significant increases in enzyme diversities were observed under all conditions, particularly with enzyme class 1 (oxidoreductases) and class 4 (lyases). Notably, lactose and cellobiose showed significant differences in their hit numbers within all enzyme classes; lactose and cellobiose showed a four-fold increase in the number of enzyme class 3 (hydrolases) and a seven-fold increase in lactose and cellobiose, when compared to those observed under the glucose condition.

For an in-depth analysis of the hydrolases used to cleave individual disaccharides, the enzymes of subclass EC 3.2 (glycosylases) were further investigated.

Influences of distinct carbohydrates on the expression of secreted hydrolases

A detailed proteomic analysis of the effects of sugar substrates on the expression of hydrolytic enzymes revealed significant differences, when comparing the glucose condition with the other carbohydrate conditions. Figure 6 shows that the hydrolases identified under the glucose condition were downregulated compared to those observed in cultures grown in disaccharide-containing

media. However, as shown in Fig. 7, numerous enzymes were specifically produced that could potentially cleave the investigated disaccharides. The predictions of the potential functions of the identified enzymes are shown in Additional file 8: Fig. S8.

Cellobiose

For the secretome cultured in media supplemented with cellobiose, a significant upregulation of the proteins H4 (β -1,3-1,4-glucanase), H6 (glucan endo-1,3- β -glucosidase), and H5 (α -amylase) was observed. Six-fold and two-fold upregulations in H6 and H4 were observed, and these proteins shared 29.4% and 44.29% sequence identity with previously reported β -glucosidases, respectively [37, 38]. Moreover, H5 was the most upregulated (16-fold) under the cellobiose condition (when compared to the glucose condition), and it shared 39.32% sequence identity with α -amylase [39]. In addition, the hydrolase H15 (exo- β -(1,3)-glucanase), which was only detected in cultures grown in cellobiose-containing media, exhibited a 42.5% sequence identity to a β -bond-cleaving enzyme [40].

Lactose

Secretome analysis of the cells cultured in lactose-containing media also showed upregulation of the H6 and H5 proteins. The four-fold upregulation of hydrolase H5 was lower than that observed in cells cultured in cellobiose-containing media; however, it differed significantly from the expression observed in cells cultured in glucose-containing media. These results indicate that the β -glucosidase H6 was released by *C. oleaginosus* cells for the cleavage of different disaccharides linked by β -1,4 glycosidic bonds. These findings are consistent with the results of Nakkharat et al., who demonstrated that β -glucosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58 can also exhibit β -galactosidase activity [41].

Maltose

Using maltose as the carbon source led to upregulation of the H5 and H6 proteins in the secreted protein fraction of *C. oleaginosus* cultures. H5 expression was upregulated nine-fold compared to that observed under the glucose condition. Furthermore, in silico analysis identified H5 as an α -amylase responsible for maltose cleavage. In addition, the H2 enzyme (α/β -glucosidase) was detectable almost exclusively in *C. oleaginosus* cultured in maltose-supplemented medium. This enzyme might cleave the α position of sugar compounds due to its 39.3% sequence identity match with a previously described α/β -glucosidase [37].

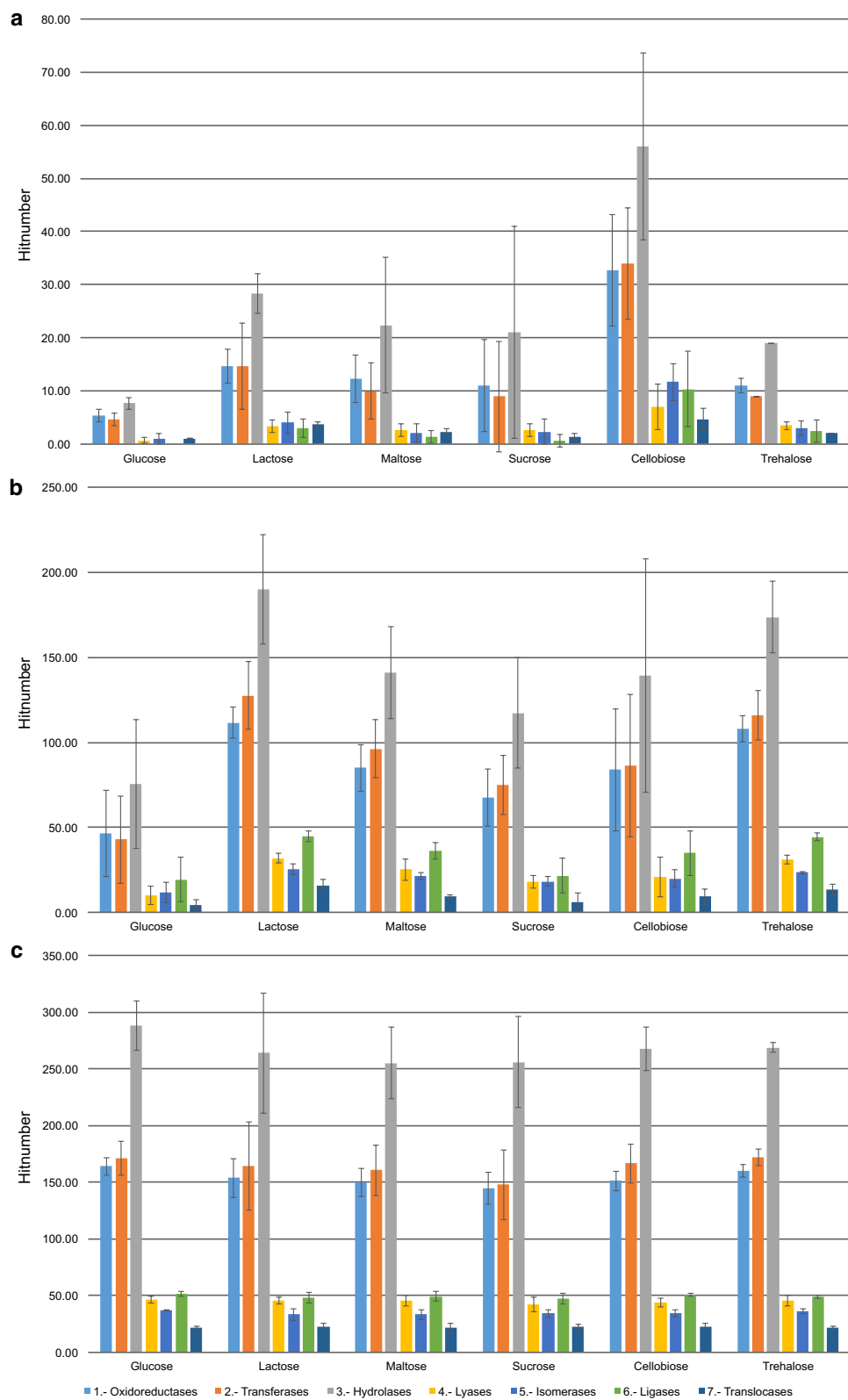
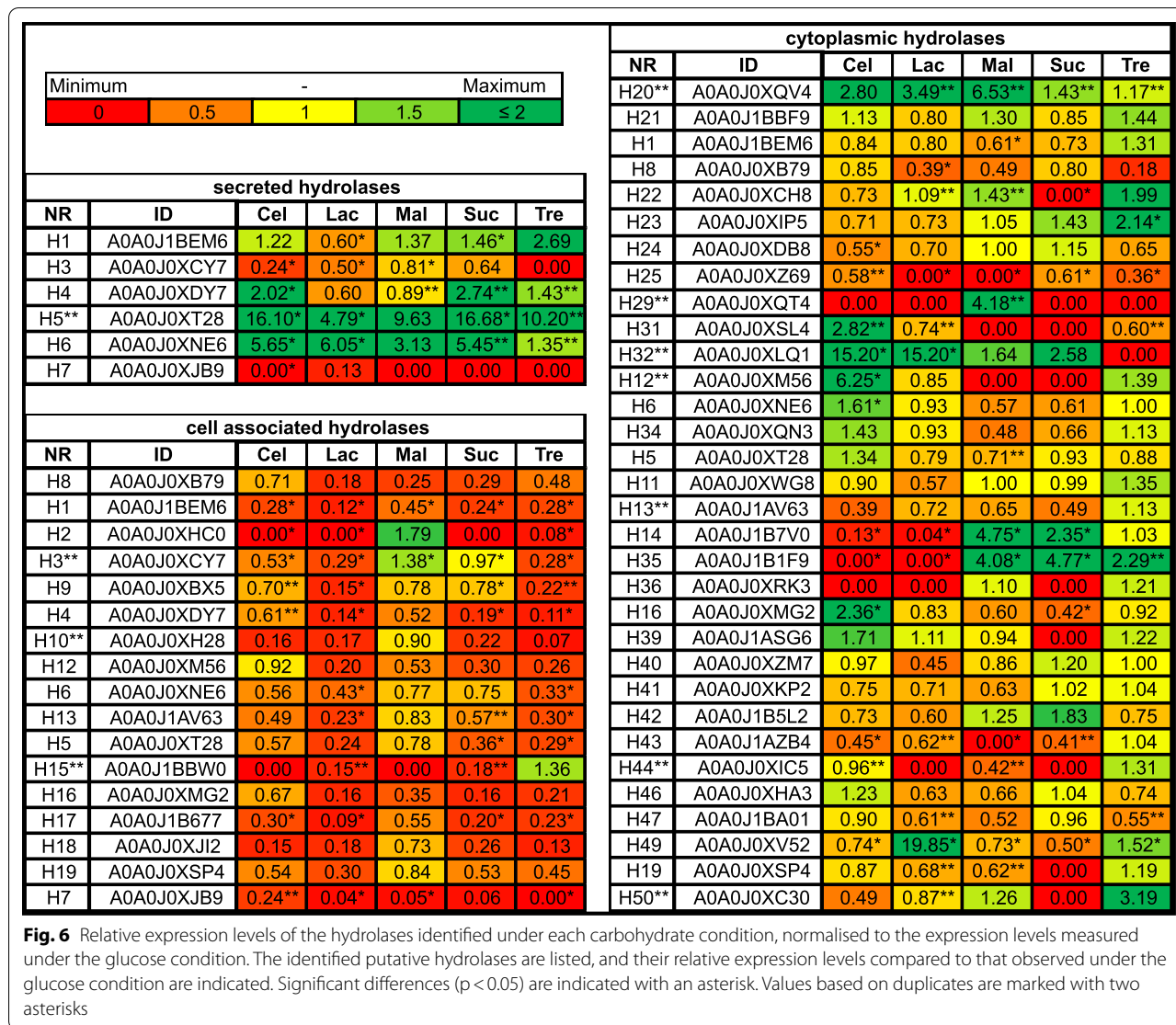


Fig. 5 Enzyme hit distribution. For each carbohydrate, the numbers of different enzymes identified (based on the EC number) are shown for the secreted, cell wall-associated, and cytoplasmic fractions



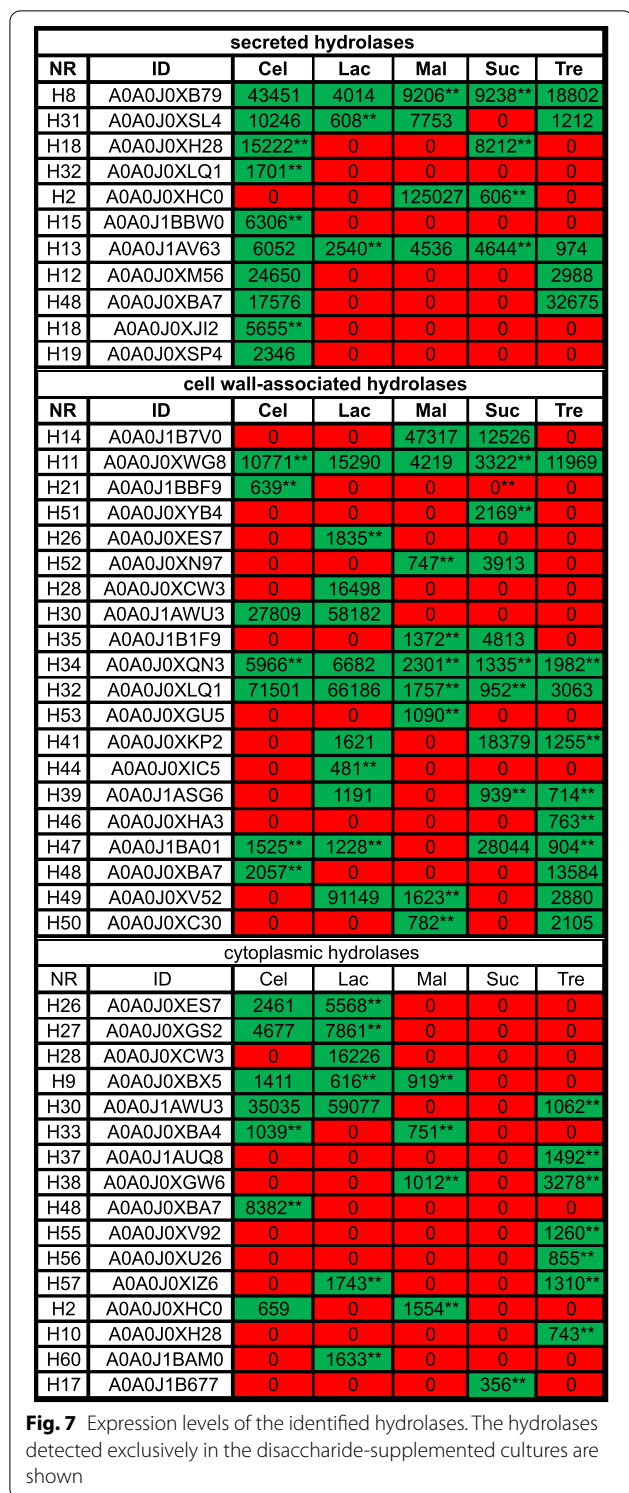
Sucrose

Analysis of the secreted protein fraction of cultures grown in sucrose-containing media revealed upregulation of proteins H1 (endo-1,3(4)-β-glucanase), H4, H5, and H6. H5 and H6 were the most upregulated proteins, exhibiting 17-fold and five-fold increases in expression, respectively. Surprisingly, although it cleaves sucrose, the H3 protein (invertase), which partly corresponds to an invertase, was downregulated. Since *C. oleaginosus* cells showed efficient growth in sucrose medium, this finding suggests that sucrose might not be hydrolysed extracellularly by *C. oleaginosus* cells; instead, membrane-associated, or intracellular processes might perform this function. This is in line with previously published data [29] describing the incapacity of *T. cutaneum* to hydrolyse sucrose extracellularly.

Trehalose

C. oleaginosus cultured in media supplemented with the disaccharide trehalose showed upregulation of the H1 (endo-1,3(4)-beta-glucanase), H4, H5, and H6 proteins in the secreted fractions. Although a relatively high upregulation of the H1 and H5 proteins was detected (17-fold and seven-fold, respectively), these proteins do not seem to be involved in trehalose hydrolysis, as indicated by the negative enzyme test.

The results of the substrate tests with concentrated protein fractions from the *C. oleaginosus* cultures are shown in Additional file 9: Fig. S9. The enzymatic tests indicated that *C. oleaginosus* can extracellularly hydrolyse disaccharides such as cellobiose, lactose, and maltose. However, sucrose and trehalose do not appear to be hydrolysed by the secreted proteins in the respective cultures. These results distinguish *C. oleaginosus* from the



Influences of different carbohydrate sources on membrane- and cell wall-associated hydrolases

Membrane- and cell wall-associated proteins play key roles in the recognition and uptake of extracellular carbohydrates [42]. A proteome analysis was performed to further elucidate the protein abundances and expression patterns in *C. oleaginosus*.

Cellobiose

All hydrolases detected in *C. oleaginosus* cultured in glucose-containing media were downregulated when cultured in media supplemented with cellobiose. However, as shown in Fig. 7, the H11 (1,4-alpha-glucan-branching enzyme), H21 (alpha/beta-hydrolase), H30 (beta-glucosidase), H34 (glycoside hydrolase), H32 (beta-mannosidase), H47 (alpha-amylase), and H48 (beta-galactosidase) enzymes (which were not detectable under the glucose condition) were identified. The presence of the H30, H32, and H47 enzymes is of importance because they might be able to cleave the beta-bound cellobiose, based on reference database entries [43–45].

Lactose

The H26 (alpha-galactosidase), H28 (beta-galactosidase), H30, H34, H32, and H47 enzymes were identified under the lactose condition, but not under the reference glucose condition. H26 and H28 shared over 45% sequence identity to galactosidases detected in *Paecilomyces thermophila* and *Arthrobacter sp.* respectively [37, 46]. Furthermore, under the lactose condition, the hydrolase H30 was upregulated three-fold compared to that observed under the cellobiose condition. Like hydrolase H6, this hydrolase seems to be able to cleave cellobiose and lactose.

Maltose

The H2 (alpha/beta-glucosidase) and H3 enzymes were upregulated in yeast cultured in maltose-containing media, compared to yeast cultured in glucose-containing media. The changes in responses to maltose were most prominent amongst the responses to the other disaccharides. The H2 enzyme, which appears to play a role in the extracellular hydrolysis of maltose, was upregulated two-fold. In addition, enzymes such as H14 (alpha-glucosidase), H52 (glycosyl hydrolase), H35 (alpha-glucosidase), or H34 were over 36% identical to putative maltose-cleaving enzymes (Fig. 7). In particular, H14 displayed a six-fold upregulation and shares homology to the alpha-glucosidase expressed in *Halomonas sp.* [47].

closely related yeast *T. cutaneum*, which cannot extracellularly hydrolyse cellobiose, lactose, and maltose, but can hydrolyse sucrose and trehalose [29].

Sucrose

The H35, H51 (α/β -hydrolase), H52, H47, and H14 enzymes play dominant roles in the hydrolysis of sucrose, a carbohydrate with high relevance to industrial fermentation. The H47 enzyme-expression level was at least 28-fold higher under the sucrose condition than under other culture conditions. Furthermore, based on its homology to α -glucosidase, H14 might be able to cleave maltose and sucrose [47]. We could further infer that other enzymes, such as H52 and H35, are also formed in the presence of sucrose and maltose (Fig. 7). This may indicate that both disaccharides partly induce the same protein-expression profiles in *C. oleagnosus*. This bifunctionality has already been described by Williamson et al. for other yeast maltases [48]. In this study, a potential α -cleaving enzyme, H51, was exclusively detected under the sucrose condition.

Trehalose

When the culture medium was supplemented with trehalose, the H11, H32, H48, H50 (neutral trehalase), and H46 (α -glucosidase) enzymes were strongly expressed. Notably, the H46 enzyme was only detected under the trehalose condition. Furthermore, this enzyme exhibits 45% sequence identity to a previously described α -glucosidase [49]. Moreover, the H50 enzyme exhibits a 50% sequence identity to the yeast trehalase identified by Alblova et al. [50]; its expression was upregulated at least three-fold in *C. oleagnosus* cultured in trehalose-containing media compared to that observed in *C. oleagnosus* cultured in glucose-containing media.

Influences of different carbohydrates on the expression of soluble cytoplasmic hydrolases

To gain a better understanding of intracellular carbon utilisation, cytoplasmic enzymes were further examined. The obtained data are presented in Figs. 6 and 7, and the regulations and annotations of the identified cytoplasmic enzymes are illustrated.

Cellobiose

A detailed examination of the cultures obtained from cellobiose-containing media indicates that nine potential hydrolases are upregulated. The H20 (α/β -hydrolase), H31 (glucan 1,3-beta-glucosidase), H32, and H12 (exo- β -(1,3)-glucanase) enzymes showed at least two-fold higher expression levels compared to those observed in cultures obtained from glucose-containing media. The corresponding identities match at least 34% with β -cleaving enzymes. The most dramatic change was observed for the H32 enzyme, which was identified in the other fractions. This specific putative β -mannosidase, which matches a β -mannosidase detected in *Myceliophthora thermophila*

[44], showed a 15-fold upregulation in cultures obtained from cellobiose-containing media. Moreover, H30 was also detected in the cytoplasmic fraction when the yeast cells were cultured in media supplemented with cellobiose or lactose.

Lactose

A similar expression pattern can be induced by lactose in the culture medium. In lactose-containing media, the H32 enzyme was the most upregulated, and the H30 enzyme-expression level increased 1.4-fold compared to that observed in cultures obtained from cellobiose-containing media. The formation of H32 and H30 in cellobiose- and lactose-based cultures indicates that *C. oleagnosus* utilises these enzymes to cleave cellobiose and lactose, respectively. Furthermore, it can be concluded that *C. oleagnosus* expresses specific enzymes to cleave various β -bound monosaccharides. Interestingly, H28 was only detected in cultures grown in lactose-supplemented media. Finally, H28 shares 45% sequence identity with a β -galactosidase previously detected in *Arthrobacter sp. 32cB* [46].

Maltose

Under the maltose condition, the expression levels of the H20, H14, and H35 enzymes were upregulated two-fold compared to those observed under the glucose condition. These enzyme sequences correspond to α -cleaving enzymes, which might play a role in cytoplasmic maltose cleavage. Further, H14 and H35 match the sequences of well-characterised glucosidases identified in the *Halomonas sp.* and *Bacillus cereus* bacteria [47, 51]. In addition, the data in Fig. 7 indicate the formation of the H2 enzyme, which might play a dominant role in the previously discussed secretomes of maltose-based yeast cultures.

Sucrose

As shown in Fig. 6, sucrose induced the expression of the H14, H35, H42 (acylpyruvate hydrolase), and H32 enzymes. The H14 and H35 enzymes showed at least 36% sequence identity to the α -glycosidases previously identified in *Halomonas sp.* and *Schizosaccharomyces pombe* [47, 52]. In addition, H20 was identified as an enzyme with 59.5% similarity to the sequence of a modelled α/β hydrolase.

Trehalose

Finally, the formation of α -1,1-bound trehalose-cleaving hydrolases was analysed. The H22 (putative diene-lactone hydrolase), H23 (α/β -hydrolase), and H35 (α -glucosidase) enzymes were upregulated two-fold under the trehalose condition, compared to the glucose

condition. The H23 enzyme shares 51% sequence identity with an α/β hydrolase. Furthermore, as shown in Fig. 7, the H55 (α/β -hydrolase), H56 (α/β -hydrolase), and H10 (glucan endo-1,3- α -glucosidase *agn1*) enzymes were only detected in the cytoplasmic fraction of *C. oleaginosus* cultured in trehalose-containing media. H55 and H56 share over 50% homology with α/β -hydrolases. These enzymes can cleave the α -1,1 bond of trehalose into glucose monomers. In addition, the expression of the potential trehalase H50, which was identified in the cell wall-associated fraction, was increased three-fold under the trehalose condition, compared to that under the glucose condition. Enzymes such as H2, H30, and H26 were disregarded from the analysis since they can cleave other disaccharides. Although the H2 enzyme was produced in the secretome of cultures obtained from trehalose-containing media, the dinitrosalicylic acid (DNS) test did not detect H2-specific activity.

The *C. oleaginosus* hydrolase composition enabled metabolic utilisation of chemically distinct disaccharides

Conducting a detailed analysis of the carbohydrate metabolism is the first step in understanding the versatile substrate use of *C. oleaginosus*. Therefore, we investigated different dimers and trimers, among the glucose epimers. In the following sections, the obtained data are interpreted, and the results are graphically summarised in Fig. 8.

Cellulose

Yeast cultures grown in cellobiose-based medium reached an OD_{600} of 2.15 after 42 h, which was the second-lowest value observed among all carbohydrate-based medium conditions tested. All analysed fractions contained different putative cellobiose-cleaving enzymes. The reduced growth on liquid cellobiose-containing medium could be explained by the higher galactosidase activity of the identified β -1–4 cleaving enzymes. This finding further explains the expression of these hydrolases in *C. oleaginosus* cells cultured in lactose-containing medium. Furthermore, it has been documented that the same glycosyl hydrolase activity can cleave several carbohydrates with different substrate affinities [41]. In addition, the high number of β -glucosidases expressed suggests that *C. oleaginosus* might cleave cellobiose intracellularly. This possibility is further supported by observations that cellulolytic fungi can carry out intracellular hydrolysis of cellobiose [53].

Lactose

Yeasts cultured in lactose-supplemented media reached an OD_{600} of 4.11, which was two-fold higher than that observed under the cellobiose condition. Since many

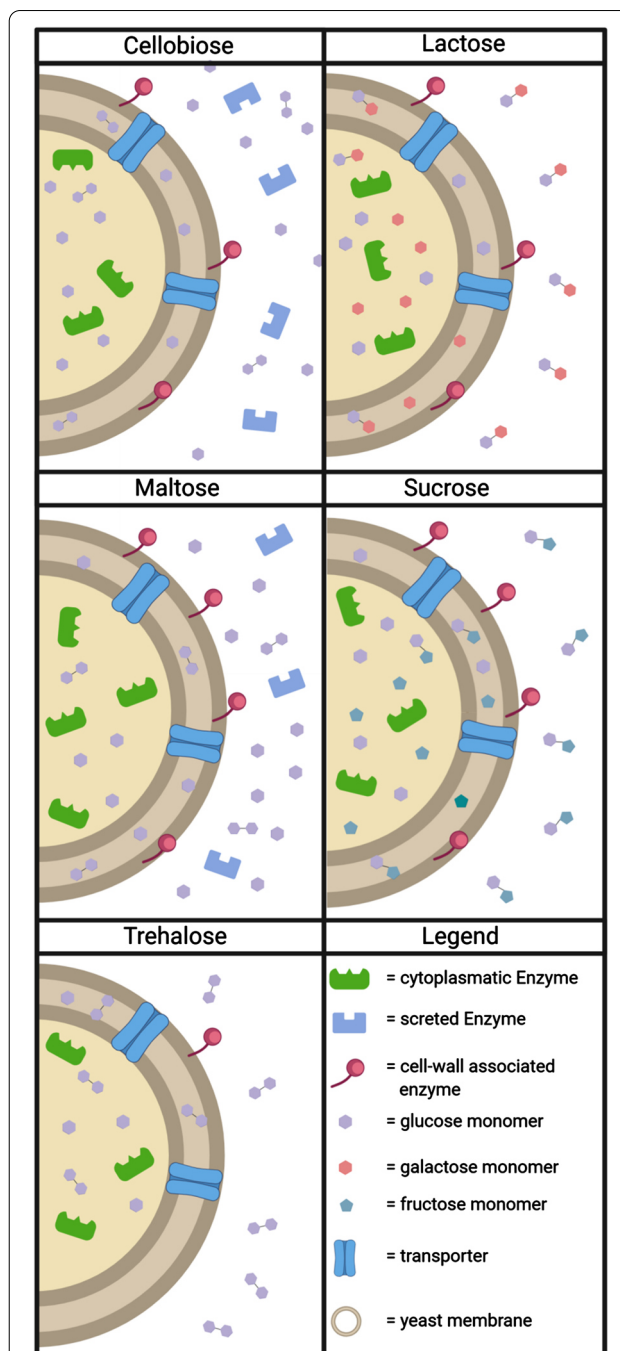


Fig. 8 Representative model of disaccharide cleavage and uptake in *C. oleaginosus*. The model illustrates the potential cleavage in the subcellular or extracellular compartment and subsequent uptake of carbohydrates by *C. oleaginosus*. The model schematically indicates which fractions (secreted, cell wall-associated, or cytoplasmic) contained the enzymes necessary for cleaving the indicated disaccharides

enzymes are expressed during growth based on either carbohydrate, we hypothesise that they have a higher enzymatic activity for the substrate lactose. In addition, *C. oleaginosus* exhibited increased expression of enzymes such as H30 and H20 in lactose-based cultures, when compared to that in cellobiose-based cultures. An indication of the localisation of lactose cleavage in *C. oleaginosus* is provided by the observation that galactosidases (such as H26 and H28) were produced, which are mainly found in the membrane and in the cytoplasm. In addition, an associated lactose permease was identified, which indicates that *C. oleaginosus* might primarily degrade lactose at the membrane or intracellularly. However, Carvalho-Silva and Spencer-Martins showed that lactose can be cleaved extracellularly in various *Kluyveromyces marxianus* strains [54]. Positive activity for lactose cleavage in the secreted fractions of *C. oleaginosus* (Additional file 9: Fig. S9) further supports this observation. In contrast, the intracellular utilisation of this carbohydrate differs in *C. oleaginosus* from that in the related strain *T. cutaneum*, which predominantly degrades lactose extracellularly [29].

Maltose

For yeast cultured in maltose-containing medium, the highest biomass increase was determined at an OD₆₀₀ of 4.75, whereas sucrose-based cultures reached an OD₆₀₀ of 4.85. The significant increase in H2 expression in the presence of maltose in the secretome highlights the efficient cleavage of this disaccharide. Additional enzymes, such as H20 and H14, were upregulated in the membrane and cytoplasm. These findings support the conclusion that *C. oleaginosus*, similar to *Cryptococcus flavus*, secretes amylases and efficiently cleaves maltose extracellularly [55]. However, this is not the case for *T. cutaneum* and many brewery yeasts [29, 56]. Since *C. oleaginosus* enzymes such as H20 and H14 are upregulated in the membrane and cytoplasm, other metabolic pathways are activated in parallel to the extracellular cleavage of maltose [57].

Sucrose

Compared to other disaccharide-based cultures, the cultures grown in sucrose-based medium showed the highest cell density, with an OD₆₀₀ of 4.85 after 42 h. Furthermore, our current analysis indicated that *C. oleaginosus* cannot degrade sucrose extracellularly, in contrast to *S. cerevisiae* [58]. However, some potential sucrose-cleaving enzymes, such as H11, H14, H20, and H35, were identified in the membrane and cytoplasmic fractions. These findings suggest that *C. oleaginosus* cleaves sucrose substrate intracellularly and/or via a membrane-associated process. This hypothesis is supported by positive

enzyme activity observed in the cell wall fraction, as well as numerous studies that have investigated the utilisation of sucrose in yeast [58].

Trehalose

Among the disaccharides investigated, the trehalose-based cultures showed the slowest growth. Although a high number of different hydrolases were observed in the membrane and cytoplasmic fractions of *C. oleaginosus*, only the detected trehalases are related to trehalose cleavage and cell growth. In addition, trehalose is often used as a storage compound or formed as part of a stress response towards dehydration or increased ethanol levels [59]. This suggests that trehalose is less suitable for *C. oleaginosus* cultivation.

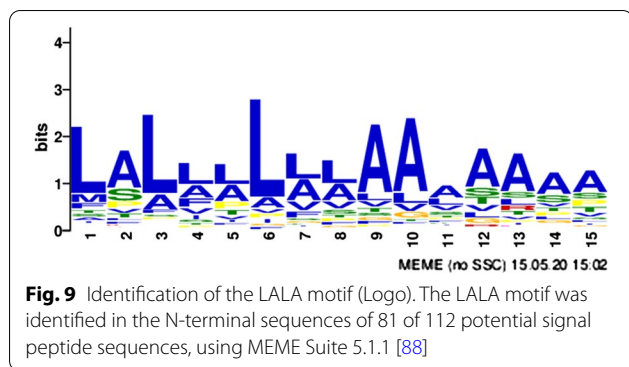
Analysis of secreted proteins

Proteins targeted toward the secretory pathway are mediated by the endoplasmic reticulum (ER)–Golgi endomembrane pathway. This is the first step in the recognition of signal sequences (such as the signal-recognition particle) and association with the ER [60]. Further protein sorting within the endomembrane system is regulated by specific sequence motifs, followed by specific glycosylation processes [61]. Thus, identifying these sequence motifs is important for improving the understanding of subcellular protein sorting and subsequent protein secretion.

To identify new signal motifs, all 1,091 secreted proteins with a $-10 \cdot \lg P$ value higher than 36 were analysed for potential signal peptides using the SignalP5.0, Phobius, and WoLF PSORT software programs. These analyses identified 112 proteins with potential eukaryotic signal-peptide motifs. These hits represented candidate signal sequences that potentially function to introduce proteins to the secretion pathway by triggering their transport into the ER.

The 112 hits were further analysed using the MEME tool (from MEME Suite 5.1.1) for novel motif elicitation against a background dataset of the 1,000 most abundant cytoplasmic enzymes. A 15 amino acid-long motif was identified, which was present in 81 of the 112 proteins ($p=9.4e-007$). The motif comprises a stretch of the hydrophobic amino acids, alanine and leucine, with the consensus sequence LALL[LA]L[LA][LA]AAAAAAA (Fig. 9). Furthermore, the motif is primarily located at the amino termini of the proteins, as a part of the predicted signal peptide, which have a hydrophobic character [62]. Nevertheless, in eight cases, the motif was also found at the C-terminal side and in some rare cases, in the middle of the protein.

Amongst the 1,091 secreted proteins selected, the consensus motif was found in 358 cases ($p<0.0001$). When



screening for the motif within the 4,498 cytoplasmic proteins detected in this study, 1,107 hits were obtained. These findings might suggest that the motif belongs to a signal peptide that triggers transport into the ER, but has no direct influence on protein secretion itself. To trigger protein secretion from the ER to Golgi and out of the cell, another signal is required, such as a pro-peptide with a certain glycosylation pattern. For the yeast *S. cerevisiae*, a combination of signal peptides (pre-peptide and pro-peptide) similar to the glycosylated pro- α -mating factor can lead to protein secretion [63]. Moreover, *P. pastoris* is an established host for the production of recombinant, secreted proteins [64]. The signal sequence for secretion is reported and can be fused to the recombinant protein to initiate cellular export. In addition, *Y. lipolytica* is also able to efficiently secrete proteins. Several secretion signals have been described and corresponding expression systems generated [65–68].

In the secreted protein fraction, glycosylated peptides could be identified (Additional file 12: Table S1). Within this dataset, the most abundant carbohydrate-based post-translational modifications were derived from glucose (delta molecular weight [MW]: 162.05), heptose (delta MW: 192.06), hexosamine (delta MW: 161.07), gluconoyl (delta MW: 178.05), and fucose (delta MW: 146.06). Within this dataset, numerous carbohydrate-related proteins that are potentially involved in cellular export were discovered. In addition, some of these glycolytic motifs were identified in hydrolases H1, H6, H8, H13, H12, H31, and H32.

Conclusions

The presence, uptake, and utilisation of different disaccharides in *C. oleaginosus* were studied using a comprehensive approach involving proteomic and morphological analyses. In this work, we addressed the influence of a selected set of different di- and trisaccharides as carbon sources for the first time in *C. oleaginosus*, followed by a wide proteomic analysis of expressed proteins.

In addition, the target compartments of the proteins were considered, including cytoplasmic, cell-associated, and secreted proteins. Based on spectral information, the relative quantification of specific proteins was possible, which provided insights into the potential functions of the newly identified proteins. The subsequent assignment of the individual proteins to their enzyme classes helped uncover information regarding their formation and functions. Significant differences in the relative abundances of each substrate in the different fractions were also detected. For example, the addition of lactose or cellobiose—compared to the glucose reference—respectively resulted in three- and five-fold higher diversities of hydrolases (enzyme class 3) in the secretome. Significant increases in expression, such as the formation of H2 (α/β -glucosidase) when maltose was added or H20 (α/β -hydrolase) and H30 (β -glucosidase) when cellobiose and lactose were used as substrates, were observed. In conclusion, the most prominent enzymes including H26, H28, H30, H32 and H47, exhibiting α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase, β -mannosidase and α -amylase activities respectively are summarized in Additional file 10: Fig. S10. Furthermore, a phylogenetic comparison of the identified hydrolases has revealed sequence and functional relationships (Additional file 11: S11). For example, the annotated α/β -glucosidase activity is found in the nearby branch of H2, H20, H21 and H25. Moreover, the annotated β -galactosidase activity is associated with the nearby branch of H28 and H30. The cumulative phylogenetic comparison therefore increased the confidence in our functional assignment of the identified proteins. In addition, by analysing the secreted enzymes, a motif with the consensus sequence LALL[LA]L[LA][LA]AAAAAAA was identified as a potential signal peptide. These insights reveal potential new substrate sources for *C. oleaginosus*, such as inexpensive metabolic by-products containing utilizable carbohydrates. Gathering information regarding the carbo-hydrolytic potential of *C. oleaginosus* allows for more precise engineering approaches. This information could be used to discover more cost-effective carbon sources for microbial lipid production by *C. oleaginosus*.

Methods

Spot assay for *C. oleaginosus*

A liquid culture of *C. oleaginosus* containing 10^7 yeast cells/mL was diluted from 10^{-2} to 10^{-10} and spotted on solid media plates containing 6.7 g/L YNB (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), supplemented with 20 g/L of the indicated carbohydrates and 20 g/L agarose. The plates were incubated for two days at 28 °C.

C. oleaginosus cultures

C. oleaginosus (ATCC 20,509) cells were cultured in media containing YNB (6.7 g/L) supplemented with 20 g/L of the indicated carbohydrates. The yeast were cultured in baffled Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 120 rotations/min and 28 °C. The cells were inoculated in 30 mL culture medium containing glucose and incubated for 24 h. The pre-cultures were used to inoculate 500 mL baffled Erlenmeyer flasks containing 150 mL YNB medium at an OD₆₀₀ of 0.1, which were then incubated for 3 days. The cells were harvested via centrifugation at 6,738 × *g* for 7 min, re-suspended in 150 mL fresh medium (without carbohydrates), and transferred in baffled Erlenmeyer flasks. After the addition of maltose, lactose, cellobiose, sucrose, trehalose, or glucose (control), the cells were cultured for 2 additional days. Each experiment was carried out in triplicate. The cultivation for the fatty acid analysis was carried out under the same conditions with an elongated cultivation time of 5 days under limiting conditions by reducing the ammonium sulphate content (nitrogen limitation) from 5.0 to 0.613 g/l.

Fatty acid analysis

The fatty acid analysis was carried out according to the method of Griffiths et. al. with the modifications of Woortman et. al. [69, 70].

Nile red staining and microscopy

The yeast cells were photographed using a microscope (Axio Lab.A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Nile red staining was performed according to a previously described method [71].

Protein extraction

Initially, secreted proteins were separated from the cells by centrifugation at 6,738 × *g* for 7 min. Cell-associated proteins were washed off the cells by re-suspension in 25 mL NaCl (150 mM). After a 10 min incubation at room temperature (RT, approximately 22 °C), the associated protein fraction was separated from the cells by centrifugation at 20,133 × *g* for 7 min. The remaining cell pellet was re-suspended in 15 mL NaCl (150 mM) and disrupted using a high-pressure homogeniser (8 bar; Avestin Europe GmbH, Mannheim, Germany). The soluble cytoplasmic protein fraction was separated from the cell debris by centrifugation at 20,133 × *g* for 7 min. In the second step, the secreted, membrane-associated, and cytoplasmic protein fractions were each filtered through a 0.45 µm filter to remove residual cellular material, precipitated with 10% trichloroacetic (v/v) acid for 30 min at 4 °C, and subsequently centrifuged at 20,133 × *g* for 10 min at 4 °C. The precipitated proteins were washed twice with 10 mL methanol (high-performance liquid

chromatography [HPLC] grade) and three times with 10 mL acetone (HPLC grade). In each washing step, the precipitated proteins were centrifuged at 20,133 × *g* for 10 min at 4 °C. Finally, each pellet was dried at RT and dissolved in 30 µL urea (8 M). The protein concentrations were determined by measuring the 260: 280 nm absorbance ratios (NanoPhotometer NP80, Implen GmbH, München, Germany).

Preparing native proteins from secreted fractions

Proteins were separated from secreted and membrane-associated fractions. Subsequently, the secreted and membrane-associated protein fractions were filtered through a 0.45 µm filter to remove residual cellular material. Further, 2.5 mL of each fraction was subjected to a buffer exchange in 25 mM 3-(*N*-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS), with 50 mM NaCl (pH 6.2) for the secreted fraction and 25 mM MOPS with 150 mM NaCl for the membrane-associated protein fraction (pH of 6.2), using PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Each fraction was then eluted in a volume of 3.5 mL. After repeating the last step three times, 14 mL of each eluted protein fractions was concentrated to a final volume of 1.5 mL using a Centriprep 10 k filter (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). All steps were carried out at 4 °C.

DNS assay

The hydrolytic activities in the generated enzyme mixtures were determined using a DNS assay [72]. Ten microliters of the DNS reagent (300 g/L sodium potassium tartrate and 10 g/L 3,5-DNS in 0.4 M NaOH) was added to 30 µL of each sample and incubated for 10 min at 95 °C in a thermocycler. The released reducing sugars were measured spectrophotometrically at 540 nm. Briefly, the reactions were conducted in a volume of 500 µL, comprising the enzyme mix and 5 mg/mL of the tested sugars. Each sample was incubated for 72 h at 28 °C.

Preparing protein samples for LC–MS/MS analysis

Proteins were run 1 cm into a 10% Criterion™ Tris–HCl Protein Gel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Visualised protein bands were excised from the gel and used for peptide isolation according to a previously described method [73, 74], with modifications. The excised gel was shredded into small pieces (<1 mm³) and washed with acetonitrile until the Coomassie Brilliant Blue was completely removed. Subsequently, the gel pieces were dried under vacuum for 15 min (GeneVac Evaporator, GeneVac HiTechTrader, Ipswich, United

Kingdom). Samples were reduced (10 mM dithiothreitol and 50 mM ammonium bicarbonate) at 56 °C for 30 min, washed with acetonitrile, and alkylated (55 mM iodoacetamide and 50 mM ammonium bicarbonate) at RT for 20 min. After a second washing step with acetonitrile, the samples were dried under a vacuum for 15 min (SpeedVac) and rehydrated in digest solution containing Trypsin Gold (V5280, Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's specifications. The enzymatic digestion was performed overnight at 37 °C, with slight shaking. Peptides were extracted from the gel pieces by a series of incubation steps (15 min each) using 50 mM ammonium bicarbonate, 100% acetonitrile, and 5% formic acid solution [75]. The collected solution was again dried under vacuum, dissolved in 1% formic acid, filtered through a 13.3 kDa spin-filter, and subsequently subjected to LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS analysis, protein identification, and quantification

Protein analysis was performed using a timsTOF Pro mass spectrometer coupled with a NanoElute LC System (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), equipped with an Aurora column (250 × 0.075 mm, 1.6 μm; IonOpticks, Hanover St., Australia). The mobile phase comprised a 0.1% (v/v) water-formic acid mixture (A) and a 0.1% (v/v) acetonitrile-formic acid mixture (B), which was added as a binary gradient at a flow rate of 0.4 μL/min. The gradient concentration started at 2% (v/v) B and was increased linearly to 17% B after 36 min. After another 18 min, the percentage of C was increased to 25% (v/v) and then increased linearly to 37% B after 6 min. After 70 min, the concentration of B was adjusted to the final value of 95% (v/v). The oven temperature during the measurements was 50 °C.

A timsTOF pro mass spectrometer (TIMS) was used in PASEF Mode with the following settings: mass range, 100–1700 mass: charge [m/z] ratio; ion mobility ramp, 0.6–1.6 V·s/cm²; 10 MS/MS scans per ion mobility ramp (total cycle time 1.16 s); charge range, 0–5; active exclusion for 0.4 min; a target intensity of 20,000 counts; and an intensity threshold of 1000 counts. Collision energy was ramped stepwise, appropriate to the ion-mobility ramp, from 20 to 59 eV. The electrospray ionisation source parameters were 1600 V for the capillary voltage and 3 L/min N₂ (as dry gas) at a dry gas temperature of 180 °C. The measurements were performed in a positive ion mode. Mass calibration was performed using the sodium formate cluster, and the TIMS was calibrated using Hexais (2,2-difluoroethoxy) phosphazene, Hexakis (2,2,3,3-tetrafluoropropoxy) phosphazene, and Chip cube high mass references (m/z ratios of 622, 922, and 1222, respectively) [76, 77].

Bioinformatics analysis

Peptide and subsequent protein identification were performed using PEAKS software (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada) [78–80] and the *C. oleagnosus* protein sequences from the UniProt database [52]. The relative protein intensities were quantified as the ratio of protein intensities normalised to the total protein intensities from the respective sample, and three biologically independent measurements were performed. For each protein, a two-sample *t*-test was performed. Glycosylated peptides from the secreted fractions were identified using the available PMTs implemented in PEAKS software. Based on the identified protein sets (protein fractions and carbohydrates), an intersection analysis was performed to generate representative groups and Venn diagrams (<http://www.interactivenn.net>, as of 14.09.2020) (Additional files 13, 14).

The classification of the proteins into the Gene Ontology (GO) classes biological process, cellular function, and molecular function was performed using OmicsBox software (BioBam Bioinformatics S.L., Valencia, Spain, Version 1.3.11) and the identified protein sets. First, a BLAST search against the CloudBlast database and an Interpro scan on CloudIPS was performed. Then, the proteins were mapped and annotated before they were assigned to the respective classes. For a more precise functional analysis of the identified potential hydrolases, sequences of similar enzymes were identified using Swiss-Model software [81–85] and the UniProt database [52].

Phylogenetic analyses were performed in Geneious Prime[®] (v2021.1.1, Biomatters Ltd.) using the “muscle alignment” for the yeast 18 s sequences (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) and the “geneious alignment” for the identified hydrolases using the “Geneious Alignment” with the consensus method majority greedy clustering.

Identifying signal peptides targeting the protein-secretion pathway in *C. oleagnosus*

To identify potential eukaryotic signal peptides, the SignalP5.0 [62], Phobius [86], and WoLF PSORT [87] software packages were used. The extraction software was used to screen for secreted proteins with a $-10 \cdot \lg_p$ higher than 36 and a signal sequence targeting the pathway of protein secretion. A hit was determined only when all three programs predicted a signal peptide for the protein.

MEME Suite 5.1.1 [88] was used for motif mining and identification in the selected dataset. Specifically, the MEME tool was used for novel motif prediction of ungapped motifs in the set of proteins potentially carrying a signal peptide. The FIMO tool was used to scan for certain motifs within a specific dataset.

Abbreviations

LC-MS/MS: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry; MW: Molecular weight; OD₆₀₀: Optical density at 600 nm; TIMS: TimsTOF pro mass spectrometer; YNB: Yeast nitrogen base.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01692-2>.

Additional file 1: Fig. S1. Phylogenetic comparison of the 18S ribosomal RNA genes from *Cutaneotrichosporon oleaginosus*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon asahii*, *Rhodotorula toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Komagataella pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Additional file 2: Fig. S2. Morphology of *C. oleaginosus* cultured in different carbohydrate-based media. The red scale bar represents 5 μm. In the left panel, microscopic images of yeast cells grown in different carbohydrate-based media are shown. *C. oleaginosus* cells cultured in (A) glucose, (B) cellobiose, (C) lactose, (D) maltose, (E) sucrose, and (F) trehalose are shown at 100× magnification. In the right panel, yeast cells cultured in the same carbohydrate-based media are shown following Nile red staining at 100× magnification.

Additional file 3: Fig. S3. Fatty acid content and profile of *C. oleaginosus* after cultivation on different disaccharides. Shown are the total fatty acid content (a) and the fatty acid profile of cultures grown for 5 days on different carbon sources and under nitrogen limitation.

Additional file 4: Fig. S4. Intersection analysis of the proteins identified in the different carbohydrate-based media. The Venn diagram shows the protein-intersection points of the investigated carbohydrates in relation to the identified proteins. The graph indicates, from top to bottom, the Venn diagrams for the secreted (a), cell wall-associated (b), and cytoplasmic fractions (c).

Additional file 5: Fig. S5. Classification of all identified proteins according to their functions in different bioprocesses.

Additional file 6: Fig. S6. Classification of all identified proteins according to their molecular functions.

Additional file 7: Fig. S7. Classification of all identified proteins according to their functions in different cellular processes.

Additional file 8: Fig. S8. Overview of the potential hydrolases identified in this study. The potential hydrolases identified in this study are listed, along with their identification (ID) numbers. The name describes the function of the enzyme with the highest sequence ID found after performing BLAST searches with the Swiss-model and UniProt databases. In addition, the reference ID is given for identification purposes. The Ref column indicates whether previous publications have identified the hydrolase of interest (+) or not (/).

Additional file 9: Fig. S9. Results of the enzyme test. Test results for each fraction for the enzymatic breakdown of the indicated carbohydrates are shown. Green highlighting indicates cleavage of the indicated disaccharide, whereas red highlighting indicates a negative reaction.

Additional file 10: Fig. S10. Overview of the most important hydrolases, as well as their function and potential substrates.

Additional file 11: Fig. S11. Phylogenetic analysis of the identified hydrolases. Major enzymes from figure EV10 are highlighted in red.

Additional file 12: Table S1. Total modified peptides.

Additional file 13: Table S2. Significant test of the detected hydrolases.

Additional file 14: Table S3. Total proteins detected.

Acknowledgements

We would like to thank the Elsevier Author Services for revising the manuscript.

Authors' contributions

TF, NM, and TB conceived the experiments and analysed the data. TF wrote the manuscript. TF conducted the experiments with support from FM, ZR, MH, SP, and PS. DA, JL, and MM reviewed the manuscript. TB and NM supervised the project and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. TB acknowledges funding by the Werner Siemens foundation for establishing the field of Synthetic Biotechnology at TUM and the Federal Ministry of Education and Research (grant number 033RC012B). The funding sources played no roles in the design of the study; in the collection, analysis, and interpretation of data; or in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Additional files).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 June 2021 Accepted: 5 October 2021

Published online: 28 October 2021

References

- Masri MA, Garbe D, Mehmer N, Brück TB. A sustainable, high-performance process for the economic production of waste-free microbial oils that can replace plant-based equivalents. *Energy Environ Sci*. 2019;12:2717–32.
- Liu XZ, Wang QM, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol*. 2015;81:85–147.
- Bisson LF, Coons DM, Kruckeberg AL, Lewis DA. Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1993;28:259–308.
- Awad D, Bohnen F, Mehmer N, Brueck T. Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:54.
- Hu C, Wu S, Wang Q, Jin G, Shen H, Zhao ZK. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4:25.
- Hu M, Wang J, Gao Q, Bao J. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *J Biotechnol*. 2018;281:81–6.
- Liang Y, Jarosz K, Wardlow AT, Zhang J, Cui Y. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* on hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse following dilute acid pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173:2086–98.
- Younes S, Brachar F, Awad D, Qoura F, Mehmer N, Brueck T. Microbial lipid production by oleaginous yeasts grown on *Scenedesmus obtusiusculus* microalgae biomass hydrolysate. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2020;43:1629–38.
- Masri MA, Jurkowski W, Shaigani P, Haack M, Mehmer N, Brück T. A waste-free, microbial oil centered cyclic bio-refinery approach based on flexible macroalgae biomass. *Appl Energy*. 2018;224:1–12.
- Chi Z, Zheng Y, Ma J, Chen S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *Int J Hydrogen Energy*. 2011;36:9542–50.

11. Masri MA, Younes S, Haack M, Qoura F, Mehler N, Brück T. A seagrass-based biorefinery for generation of single-cell oils for biofuel and oleochemical production. *Energy Technol.* 2018;6:1026–38.
12. Kim JH, Roy A, Jouandot D, Cho KH. The glucose signaling network in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:5204–10.
13. Flores C-L, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;24:507–29.
14. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:506–77.
15. Tchakouteu SS, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Koutinas AA, Aggelis G, Papanikolaou S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2015;117:657–72.
16. Saloheimo M, Pakula TM. The cargo and the transport system: Secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology.* 2012;158:46–57.
17. Novy V, Nielsen F, Seiboth B, Nidetzky B. The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei*: a review on productivity, gene regulation and secretion profiles. *Biotechnol Biofuels.* 2019;12:238.
18. Kothari N, Bhagia S, Zaher M, Pu Y, Mittal A, Yoo CG, et al. Cellulose hydrolysis by: *Clostridium thermocellum* is agnostic to substrate structural properties in contrast to fungal cellulases. *Green Chem.* 2019;21:2810–22.
19. Mohapatra S, Mishra SS, Das SK, Thatoi H. Influence of reactors, microbial carbohydrate uptake, and metabolic pathways on ethanol production from grass biomass: a review. *Int J Energy Res.* 2019;43:1615–46.
20. van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttkik MAH, et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006;90:391–418.
21. Jordà J, Suarez C, Carnicer M, ten Pierick A, Heijnen JJ, van Gulik W, et al. Glucose-methanol co-utilization in *Pichia pastoris* studied by metabolomics and instantaneous 13C flux analysis. *BMC Syst Biol.* 2013;7:17.
22. Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Ståhlberg A, Boles E, Hohmann S, et al. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* 2004;5:532–7.
23. Kok MV, Ozgur E. Characterization of lignocellulose biomass and model compounds by thermogravimetry. *Energ Source Part A.* 2017;39:134–9.
24. Brethauer S, Studer MH. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals—a review. *Chimia (Aarau).* 2015;69:572–81.
25. Satyawali Y, Balakrishnan M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. *J Environ Manage.* 2008;86:481–97.
26. Araujo-Silva R, Mafra ACO, Rojas MJ, Kopp W, Giordano RDC, Fernandez-Lafuente R, et al. Maltose production using starch from cassava bagasse catalyzed by cross-linked β -amylase aggregates. *Catal.* 2018;8:170.
27. Paterson AHJ. Production and uses of lactose. *Adv Dairy Chem.* 2009;3:105–20.
28. Yaguchi A, Robinson A, Mihealsick E, Blenner M. Metabolism of aromatics by *Trichosporon oleaginosus* while remaining oleaginous. *Microb Cell Fact.* 2017;16:1–12.
29. Mörtberg M, Neujahr HY. Transport and hydrolysis of disaccharides by *Trichosporon cutaneum*. *J Bacteriol.* 1986;168:734–8.
30. Zeng J, Zheng Y, Yu X, Yu L, Gao D, Chen S. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioreour Technol.* 2013;128:385–91.
31. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The Yeasts.* 2011;1:87–110.
32. Morrow CA, Fraser JA. Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res.* 2009;9:161–77.
33. Torres-Guzmán JC, Domínguez A. HOY1, a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6283–93.
34. Kim J, Cheon SA, Park S, Song Y, Kim J-Y. Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;190:9–12.
35. Zakhartsev M, Reuss M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Res.* 2018;18:52.
36. Burgard J, Grünwald-Gruber C, Altmann F, Zanghellini J, Valli M, Mattanovich D, et al. The secretome of *Pichia pastoris* in fed-batch cultivations is largely independent of the carbon source but changes quantitatively over cultivation time. *Microb Biotechnol.* 2020;13:479–94.
37. Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:11417–22.
38. Cheng YS, Huang CH, Chen CC, Huang TY, Ko TP, Huang JW, et al. Structural and mutagenetic analyses of a 1,3–1,4- β -glucanase from *Paecilomyces thermophila*. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844:366–73.
39. Han P, Zhou P, Hu S, Yang S, Yan Q, Jiang Z. A novel multifunctional α -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: Biochemical characterization and three-dimensional structure. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170:420–35.
40. Cutfield JF, Sullivan PA, Cutfield SM. Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Eng Des Sel.* 2000;13:735–8.
41. Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *J Biotechnol.* 2006;123:304–13.
42. Hedin LE, Illergård K, Elofsson A. An introduction to membrane proteins. *J Proteome Res.* 2011;10:3324–31.
43. Tsukada T, Igarashi K, Yoshida M, Samejima M. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;73:807–14.
44. Dotsenko GS, Semenova MV, Sinitsyna OA, Hinz SWA, Wery J, Zorov IN, et al. Cloning, purification, and characterization of galactomannan-degrading enzymes from *Myceliophthora thermophila*. *Biochemistry.* 2012;77:1303–11.
45. Lyhne-Iversen L, Høbley TJ, Kaasgaard SG, Harris P. Structure of *Bacillus halmapalus* α -amylase crystallized with and without the substrate analogue arabinose and maltose. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2006;62:849–54.
46. Rutkiewicz M, Bujacz A, Bujacz G. Structural features of cold-adapted dimeric GH2 β -D-galactosidase from *Arthrobacter* sp. 32cB. *Biochim Biophys Acta.* 2019;1867:776–86.
47. Shen X, Saburi W, Gai Z, Kato K, Ojima-Kato T, Yu J, et al. Structural analysis of the α -glucosidase HaG provides new insights into substrate specificity and catalytic mechanism. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2015;71:1382–91.
48. Williamson PR, Huber MA, Bennett JE. Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*. *Biochem J.* 1993;291:765–71.
49. Satoh T, Toshimori T, Yan G, Yamaguchi T, Kato K. Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control. *Sci Rep.* 2016;6:1–7.
50. Alblova M, Smidova A, Docekal V, Vesely J, Herman P, Obsilova V, et al. Molecular basis of the 14–3–3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E9811–20.
51. Watanabe K, Hata Y, Kizaki H, Katsube Y, Suzuki Y. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J Mol Biol.* 1997;269:142–53.
52. Bateman A. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D506–15.
53. Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JHD. Cel-lodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science.* 2010;330:84–6.
54. Carvalho-Silva M, Spencer-Martins I. Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1990;57:77–81.
55. Wanderley KJ, Torres FA, Moraes LM, Ulhoa CJ. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;231:165–9.
56. Vidgren V, Ruohonen L, Londesborough J. Characterization and functional analysis of the MAL and MPH loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7846–57.

57. Viana PA, de Rezende ST, Lopes FMP, Machado SG, Maitan GP, da Silva Coelho VT, et al. α -Galactosidases production by *Debaryomyces hansenii* UFV-1. *Food Sci Biotechnol*. 2011;20:601–6.
58. Basso TO, de Kok S, Dario M, do Espirito-Santo JCA, Müller G, Schlögl PS, et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metab Eng*. 2011;13:694–703.
59. Basso LC, De Amorim HV, De Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:1155–63.
60. Costa EA, Subramanian K, Nunnari J, Weissman JS. Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science*. 2018;359:689–92.
61. Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, Hajiebrahimi A, Ghasemi Y. A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications. *Eur J Cell Biol*. 2018;97:422–41.
62. Nielsen H, Tsigos KD, Brunak S, von Heijne G. A brief history of protein sorting prediction. *Protein J*. 2019;38:200–16.
63. Waters MG, Evans EA, Blobel G. Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence. *J Biol Chem*. 1988;263:6209–14.
64. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005;22:249–70.
65. Enderlin CS, Ogrzydziak DM. Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 1994;10:67–79.
66. Nicaud JM, Fabre E, Beckerich JM, Fournier P, Gaillardin C. Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease (XPR2) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*. 1989;12:285–97.
67. Nicaud JM, Madzak C, Van Den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*. 2002;2:371–9.
68. Park Y-K, Vandermiss M, Soudier P, Telek S, Thomas S, Nicaud J-M, et al. Efficient expression vectors and host strain for the production of recombinant proteins by *Yarrowia lipolytica* in process conditions. *Microb Cell Factories*. 2019;18:1–12.
69. Griffiths MJ, van Hille RP, Harrison STL. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids*. 2010;45:1053–60.
70. Woortman DV, Fuchs T, Striegel L, Fuchs M, Weber N, Brück TB, et al. Microalgae a superior source of folates: quantification of folates in halophile microalgae by stable isotope dilution assay. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;7:481.
71. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. 1985;100:965–73.
72. Wood IP, Elliston A, Ryden P, Bancroft I, Roberts IN, Waldron KW. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass Bioenergy*. 2012;44:117–21.
73. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996;68:850–8.
74. Granvogl B, Gruber P, Eichacker LA. Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry. *Proteomics*. 2007;7:642–54.
75. Awad D, Brueck T. Optimization of protein isolation by proteomic qualification from *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Anal Bioanal Chem Springer*. 2020;412:449–62. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02254-7>.
76. Sandow JJ, Infusini G, Dagley LF, Larsen R, Webb AI. Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF Pro. *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/657908>.
77. Meier F, Brunner AD, Koch S, Koch H, Lubeck M, Krause M, et al. Online parallel accumulation–serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17:2534–45.
78. Tran NH, Qiao R, Xin L, Chen X, Liu C, Zhang X, et al. Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nat Methods*. 2019;16:63–6.
79. Tran NH, Zhang X, Xin L, Shan B, Li M. De novo peptide sequencing by deep learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:8247–52.
80. Tran NH, Rahman MZ, He L, Xin L, Shan B, Li M. Complete de novo assembly of monoclonal antibody sequences. *Sci Rep*. 2016;6:31730.
81. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011;27:343–50.
82. Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep*. 2017;7:1–15.
83. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. 2009;30:5162–73.
84. Studer G, Rempfer C, Waterhouse AM, Gumienny R, Haas J, Schwede T. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*. 2020;36:1765–71.
85. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:W296–303.
86. Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*. 2004;338:1027–36.
87. Nakai K, Kanehisa M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 1992;14:897–911.
88. Bailey TL, Bodén M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:W202–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4 Diskussion

4.1 Nachhaltige Produktion von mikrobiellen Hochwertstoffen

Eine große Herausforderung unserer Zeit ist die nachhaltige Produktion von Wertstoffen wie Biokraftstoffen, Pharmazeutika und hochwertigen sowie funktionellen Lebensmitteln. Die aktuelle Nachfrage nach diesen Produkten nimmt aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung konstant zu und zwingt uns zur Entwicklung neuer Lösungsansätze. Ein Beispiel ist die Gewinnung von Biokraftstoff aus Rapsöl, welches Diesel zu 100% ersetzen kann. Jedoch haben diese Methoden der Biokraftstoffgewinnung den großen Nachteil, dass die Kultivierung der terrestrischen Pflanzen oftmals große Flächen benötigt wodurch diese mit der Produktion von Lebensmittelpflanzen in Konkurrenz tritt.⁹⁵ Mikroorganismen wie die Mikroalgen *Botryococcus braunii* und *Schizochytrium spp.*, welche bis zu 70% Lipid akkumulieren können, bilden hier eine Alternative, da die Lipidausbeute pro Hektar verglichen mit terrestrischen Pflanzen um ein Vielfaches höher liegt.^{12,96,97} Auch die Gewinnung von hochwertigen, vitaminreichen Lebensmitteln ist mit einem großen Flächen- und Energieaufwand verbunden. Um dennoch eine Steigerung der Produktion von funktionalen Lebensmitteln für die stetig wachsende Weltbevölkerung zu gewährleisten, sind neue Strategien notwendig. Schon heute werden Mikroorganismen wie die Biomasse von *Chlorella vulgaris* als Zusatz in Smoothies oder *S. cerevisiae* zur Produktion von Bier verwendet.^{98,99} Jedoch wird bei näherer Betrachtung dieser Prozesse sichtbar, dass sie aktuell aus Kostengründen nicht in Konkurrenz zu etablierten, umweltschädigenden Methoden treten können.⁹⁸ Aus diesem Grund ist es essenziell, das Wertstoffportfolio durch neue Mikroorganismen zu erweitern sowie die bestehenden Methoden mithilfe von Prozessoptimierungen kosteneffizienter zu gestalten. Die in dieser Arbeit eingebundenen Studien sowohl eine Basis für Prozessoptimierungen als auch für die Entwicklung von neuen Prozessen.

4.2 Mikroalgen-basierte Wertstoffe

Das wissenschaftliche Interesse an Mikroalgen-basierten Prozessen zur Produktion von Chemikalien ist in den letzten 20 Jahren stetig gestiegen. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass die meisten Abhandlungen sich mit dem Thema Lipidproduktion auseinandersetzen.^{100–102} Lipide können z.B. durch eine Umesterung unter Zugabe von Methanol und einem Katalysator zu Biokraftstoff umgewandelt werden.¹⁰³ Bei der Lipidproduktion sowie deren Verarbeitung wird auch die Gewinnung weiterer Koppelprodukte wie Zellmetabolite, Proteine, Vitamine und der entstandenen Biomasse diskutiert.^{104,105} Jedoch steht meist die Entwicklung der Prozesse hin zu einer maximalen Lipidausbeute im Mittelpunkt, wobei die Einflüsse auf die Bildung hochwertiger Koppelprodukte nicht berücksichtigt werden. So existieren nur wenige

Abhandlungen zur parallelen Produktion von mehreren Hochwertprodukten wie zum Beispiel die Produktion von Asthaxantin und Lipiden durch die Mikroalge *H. pluvialis*.¹⁰⁶

Da eine gesunde Ernährungsweise auch in Schwellenländern immer mehr in den Vordergrund rückt, werden neue, nachhaltige Möglichkeiten der Lebensmittelproduktion benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass Mikroalgen ein vielversprechendes Potenzial besitzen, Bestandteil dieser Produktion zu sein.¹⁰⁴ Ein Beispiel ist die Bildung hochwertiger Produkte wie Asthaxantin, welches zum Färben von Lachsfleisch verwendet wird und als Radikalfänger das menschliche Immunsystem unterstützt, oder der Vitamine E und C, welche während der Produktion von Lebensmitteln zugegeben werden.¹⁰⁷ In unserer Studie „Microalgae a Superior Source of Foliates: Quantification of Foliates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay“ wurde mit Schwerpunkt auf halophile Chlorophyta gezeigt, dass Mikroalgen das Potenzial als Lieferant von Vitamin B₉ besitzen. Hierzu wurden im Verlauf der Studie hergestellte Mikroalgenbiomasse auf ihre Folatgehalte hin untersucht und die gewonnenen Daten mit dem Folatgehalt kommerziell hergestellter trockener *Chlorella vulagris*-Biomasse verglichen. So konnte gezeigt werden, dass die getrocknete Biomasse mit bis zu 2450 ± 52,1 µg/100g einen relativ hohen Folatgehalt aufwies, der jedoch verglichen mit frischer *C. vulagris*-Biomasse nur die Hälfte der Menge betrug. Die Betrachtung von *Chlorella sp.* war im Hinblick auf eine Zulassung als Nahrungsmittel bedeutend, da diese von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) mit dem GRAS-Status (generally regarded as safe) versehen wurde und somit für die Produktion von Lebensmitteln verwendet werden kann. Zwar zeigten andere Stämme wie *Picochlorum sp.* und *Dunaliella sp.* deutlich höhere Konzentrationen an Folat, jedoch würde eine spätere Zulassung von Nahrungsmitteln, die auf diesen halophilen Mikroalgen basieren, deutlich erschwert werden. Dennoch zeigt der Gesamtfolatgehalt, von 6470µg/100g Folat bei *Picochlorum sp.* (aktuell höchster nachgewiesener Wert in Mikroalgen), dass in Zukunft eine Erforschung in diesem Bereich wichtig ist. Die in unserer Studie gemessenen Folatkonzentrationen stimmen ebenfalls mit früheren Studien wie der von Brown et al überein, welche in den australischen Mikroalgenstämmen *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Stichococcus sp.* und *Pavlova pinguis* Folatmengen zwischen 1700 und 2600µg/100g nachwies.¹⁰⁸ Eine weitere Studie von in Japan gesammelten und getrockneten Mikroalgen zeigte Werte zwischen 1500 und 3600µg/100g.¹⁰⁹ Diese Ergebnisse zeigen die Relevanz, welche Mikroalgen in zukünftigen Produkten spielen könnten.

Neben der Wahl des jeweiligen Mikroalgenstamms sind der Einfluss von Nährstoffen und Stressfaktoren weitere Punkte, die bei der Produktion von Vitaminen herangezogen werden müssen. In der Literatur wird häufig der Einfluss dieser Faktoren auf die Produktion von Lipiden beschrieben, so z.B. die Limitation von Nitrat oder Phosphat.^{71,110} Der Einfluss von Stress auf die Bildung von Vitaminen wird im Gegensatz dazu nur selten untersucht, und wenn doch, stehen meist die Vitamine C und E im Vordergrund. Aus diesem Grund war ein weiterer

Schwerpunkt unserer Studie, diese Einflüsse auf die Bildung von Folat bei der Süßwassermikroalge *Chlorella sp.* zu untersuchen.¹¹¹ Wir konnten zeigen, dass eine Limitation an Nitrat im Kultivierungsmedium, welche sich bei den meisten Mikroalgen positiv auf den Gesamtlipidgehalt auswirkt, während der Zellkultivierung zu einer Reduktion der Folatkonzentration von $2000 \pm 66,6\mu\text{g}/100\text{g}$ auf $1200 \pm 28,7\mu\text{g}/100\text{g}$ in der Biomasse führte. Diese Reduktion steht im Gegensatz zur Bildung anderer Vitamine, wie E und C, deren Bildung durch Nitrat- und Phosphatlimitation in vergleichbaren Mikroalgen positiv beeinflusst wird.¹¹² So konnte gezeigt werden, dass durch diese Limitationen bei den Mikroalgen *C. vulagris* und *P. tricornutum* die Bildung von Vitamin E und C induziert wird sowie bei der Alge *T. suecica* der Gehalt an Vitamin C von ca. 0,1 auf 2,9 mg per Chlorophyll anstieg.¹¹² Dies konnte ebenfalls beim Stamm *Nannochloropsis oculata* nachgewiesen werden, welcher durch Nitratlimitation mehr Vitamin C bildet.⁴²

Da eine Kultivierung in salzhaltigem Medium aus Prozess- und Kostengründen interessant ist, war ein weiterer Punkt unserer Arbeit der Einfluss von osmotischem Stress, welcher durch Zugabe von NaCl induziert wurde. Die Auswirkungen von Salzstress auf Marinemikroalgen ist von einigen Forschenden untersucht wurden.^{113–115} Im Gegensatz dazu mangelt es an Literatur zum Thema Salzstress bei Süßwasseralgen. Die meisten Studien zu Salzstress bei Süßwasseralgen behandeln die Bildung von Glycerin, welches von einigen *Dunaliella*-Stämmen wie *Dunaliella tertiolecta* und *Dunaliella salina* unter osmotischem Stress vermehrt gebildet wird.^{116–120} Jedoch gibt es keine Beschreibung über den Einfluss auf die Produktion von Vitaminen wie Folat. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass nach der Nitratlimitation die zweitstärkste Reduzierung am Gesamtfolatgehalt von *Chlorella sp.* unter Salzstress erfolgte, wobei sich der Folatgehalt unter Zugabe von 1% NaCl zum Kultivierungsmedium von $2000 \pm 66,6\mu\text{g}/100\text{g}$ auf $1560 \pm 50,7\mu\text{g}/100\text{g}$ reduzierte.

Im Gegensatz zu den vorherigen Stressfaktoren konnten keine Unterschiede des Gesamtfolatgehaltes durch Beleuchtung mit grünem bzw. blau-rotem Licht erreicht werden. Jedoch konnte eine Verteilungsveränderung innerhalb der Folatisomere (PteGlu, H₄folat, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, und 10-CHO-PteGlu) nachgewiesen werden. So stieg bei Beleuchtung mit grünem Licht die Menge an 5-CHO-H₄folat verglichen zur Referenzkultur um ca. 12%. Diese Erkenntnis könnte in späteren Prozessen von Nutzen sein, da die unterschiedliche Stabilität der Folatvitamere zu einer veränderten Bioverfügbarkeit führt.¹²¹

4.3 Grundlagenerforschung eines Hefemetabolismus zur späteren Prozessoptimierung

Hefen bilden ein breites Spektrum an verwertbaren Metaboliten und werden aus diesem Grund in vielen Prozessen eingesetzt. Als Beispiele sind die Produktion von Ethanol oder Lipiden zu nennen.^{122,15} Um die Herstellungsprozesse dieser Stoffe möglichst effektiv zu nutzen und zu optimieren, ist ein Grundverständnis über die metabolischen Abläufe nötig. Hierzu zählen neben der Verwertung unterschiedlicher und neuer Substratquellen sowie deren Einfluss auf die Enzymexpression auch der Einfluss von Nährstofflimitationen. Ein häufig in der Literatur behandeltes Beispiel ist die Steigerung der Lipidausbeute mithilfe von Stickstoff- oder Phosphatlimitation.¹²³ Im Gegensatz dazu kann auch durch gezielte gentechnische Veränderungen im Erbmateriale der Hefen eine Produktoptimierung oder Steigerung der Produktivität erreicht werden.^{124,125} So konnte, wie das Beispiel *Lipomyces starkeyi* zeigt, durch genetische Optimierungen eine gesteigerte Lipidproduktivität von 30,7% mit einer zusätzlichen leichten Veränderung der Fettsäurezusammensetzung erreicht werden.¹²⁶ Gleiches gilt für die oleogene Hefe *Yarrowia lipolytica*, welche durch gentechnische Optimierung eine vierfach höhere Lipidproduktivität im Vergleich zur Kontrollkultur aufwies.¹²⁷ Es existiert eine Vielzahl an Literatur, welche das Grundverständnis über die metabolischen Abläufe, wie den Transport von Kohlenhydraten und die Identifizierung von Hydrolasen in diesen Hefen, geschaffen hat.^{128,129,130,131,132} Für die oleogene Hefe *C. oleaginosus*, welche ebenfalls ein großes Potenzial bei der Produktion von Lipiden aufweist, ist nur wenig bekannt.^{60,133,134} Um zukünftig gezielte Prozessoptimierungen durch Substratwechsel bzw. genetische Optimierung vorzunehmen, sind weitere Erkenntnisse über die Nutzbarkeit neuer Substrate sowie die metabolische Antwort auf diese essenziell. Aus diesem Grund befasst sich unsere Arbeit „Identifying carbohydrate-active enzymes of *C. oleaginosus* using systems biology“ mit der Erforschung der metabolischen Reaktion von *C. oleaginosus* auf verschiedene Kohlenhydrate. Hierbei wurden gut verfügbare dimere Kohlenhydrate, wie Cellobiose, Lactose, Maltose, Trehalose und Saccharose, verwendet und ihr Einfluss auf den Metabolismus im Vergleich zu Glukose betrachtet. Als Basis wurden das Wachstumsverhalten sowie die Morphologie während der Kultivierung untersucht. Hierbei konnten Unterschiede zu vorherigen Publikationen nachgewiesen werden. So zeigte Awad et al., dass die Disaccharide Saccharose und Maltose ähnliche bzw. reduzierte Biomassekonzentrationen im Vergleich zu Glukose aufwiesen und Lactose am besten umgewandelt wird.⁶⁰ In unserer Studie wurden jedoch mit einer optischen Dichte bei 600nm von 4,75 bzw. 4,85 die höchsten Werte bei Saccharose und Maltose nachgewiesen. Im Vergleich hierzu zeigte Glukose mit einer OD₆₀₀ von 2,58 eine geringere Menge an Biomasse. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte, wie ebenfalls für andere Hefen gezeigt, die unterschiedliche Medienzusammensetzung sein, was wiederum zeigt, dass neben der spezifischen Kohlenhydratquelle auch die anderen Makro-

und Mikronährstoffe einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten dieser Hefe besitzen.¹³⁵ Zusätzlich konnten je nach verwendetem Kohlenhydrat Veränderungen in der morphologischen Erscheinung der einzelnen Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden. Hierbei sind vor allem die größeren Zellen bei Saccharose und die stäbchenförmigen Zellen bei Zugabe von Trehalose (als Substrat) zu nennen. Speziell Trehalose wird häufig als Speicherverbindung zur Stressvermeidung gebildet und könnte aus diesem Grund zu einer Stressreaktion der Zelle führen.¹³⁶ Ein ähnliches morphologisches Verhalten auf Stressfaktoren konnte bei der oleogenen Hefe *Yarrowia lipolytica* nachgewiesen werden, welche ihre Form unter Indizierung von oxidativem oder thermischen Stress durch Hyphenbildung, gepaart mit einer um 25% erhöhten Dehnung, änderte.¹³⁷ In der Folge wurden detaillierte Daten über den Abbau der dimeren Kohlenhydrate erhoben. Hierzu wurden sekretierte, Membran-assoziierte und cytoplasmatische Proteinfractionen im Detail betrachtet, was eine genauere Bestimmung des Abbauverhaltens der dimeren Kohlenhydrate durch *C. oleaginosus* erlaubte. Wie zu erwarten wurden, ausgehend vom Sekretom hin zum Cytoplasma, immer größere Mengen an verschiedenen Enzymen detektiert. Interessanterweise unterschied sich jedoch die Variation an unterschiedlichen Enzymen jeder EC-Klasse je nach Kohlenhydratquelle signifikant. In den Analysen konnten substratspezifische Enzyme identifiziert werden, die ausschließlich in Gegenwart eines Substrats gebildet wurden. Die so gewonnenen Daten ermöglichen es, bei einer späteren gentechnischen Veränderung die Expression von bestimmten Enzymen durch einen Kohlenstoffwechsel zu induzieren. Dadurch wird es möglich, den Zeitpunkt einer ausgewählten Enzymexpression exakt festzulegen und so die zukünftigen Prozessführungen zu stabilisieren. Diese gezielte Expression wurde schon beim Mikroorganismus *Pichia pastoris*, welcher durch Zugabe von Methanol zur Sekretion von Lipasen angeregt wurde, gezeigt.¹³⁸ Ein weiteres Beispiel ist die Induzierung des POX2-Promoters durch Ölsäure bei der Kultivierung der oleogenen Hefe *Yarrowia lipolytica* in glukosehaltigem Medium.¹³⁹

Des Weiteren wurde das Expressionsverhalten der Hydrolasen unter Zugabe der verschiedenen dimeren Kohlenhydrate in den Fraktionen verglichen. Die hieraus gewonnenen Daten bilden eine Grundlage für folgende gentechnische Stammoptimierungen und daraus folgende Prozessverbesserungen. So kann der potenzielle Verwertungsort (Sekretom, Membran, Cytoplasma) zeigen, welche Schritte für das Zellwachstum limitierend wirken, und damit helfen, Lösungsansätze zu identifizieren. Als Beispiel weisen die Daten unserer Studie auf eine intrazelluläre Verstoffwechslung von Cellobiose hin, welche ebenfalls für cellulolytische Pilze wie *Neurospora crassa* und *Penicillium oxalicum* beschrieben wurde.^{140,141} Diese exprimieren Cellodextrin-Transporter (Cellodextrin-Permeasen), welche dafür sorgen, dass eine ausreichende Menge an Cellobiose zur Verwertung in das Zellinnere transportiert wird.^{141,142} Die Einbringung eines solchen zusätzlichen Cellobiose-Transporters könnte für ein

verbessertes Wachstum von *C. oleaginosus* auf Cellobiose-haltigen Medien sorgen und dadurch diesen Hefestamm für weitere Prozesse, die auf Cellobiose-basierenden Substraten gründen, interessant machen.¹⁴² Vergleichbare Ergebnisse wurden schon durch die genetische Veränderung der Hefe *S. cerevisiae* erreicht.¹⁴³ Hierbei ermöglichte die Einführung eines potenziellen Cellobiose-Transporters in *S. cerevisiae* bzw. dessen Verbesserung, dass sie in der Lage war, auf Cellobiose-haltigen Medien zu wachsen.^{143,142,4} Außerdem kann eine gesteigerte Expression, gepaart mit einem guten Wachstum, wie es bei dem Dimer Maltose der Fall ist, auf neue potenziell hoch aktive Enzyme, wie die in dieser Studie als H₂ bezeichnete Alpha/beta-glucosidase, hinweisen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Aufklärung des Proteinsekretionsmechanismus. Hier kommen, wie aus der Literatur bekannt, Signalpeptide zum Einsatz^{144–146}. Die Sekretion eukarontischer Organismen verläuft in der Regel über das Endoplasmatische Retikulum, wobei Signalsequenzen zum Einsatz kommen.¹⁴⁶ Aus diesem Grund bildet die Identifizierung dieser speziellen Signalsequenzen eine wichtige Rolle bei dem Verständnis von Proteinsekretion und wurde genau untersucht. Hierbei konnte ein 15 Aminosäure langes Motiv, welches in 81 von 112 Proteinen nachgewiesen wurde, identifiziert werden. Dieses Signalpeptid kann bei späteren gentechnischen Arbeiten dazu verwendet werden, dass *C. oleaginosus* neu eingebrachte Proteine gezielt sekretiert. Dies könnte zum einen, wie schon bei der Hefe *S. cerevisiae* anhand des Beispiels von Xylose und Cellobiose gezeigt wurde, dazu führen, dass *C. oleaginosus* in der Lage ist, neue Substrate wie Black Liquor oder Melibiose zu verwerten.¹⁴⁷ Zum anderen könnte es genutzt werden, dass während des Prozesses der Lipidproduktion neue Enzyme ins Medium abgegeben werden, welche im späteren Verlauf aufgereinigt werden können. Die Gewinnung von Nebenprodukten könnte es ermöglichen, die auf *C. oleaginosus* basierenden Prozesse rentabler zu gestalten und zusätzlich die Substratpalette zu erweitern.

5 Ausblick

Die kontinuierlich wachsende Weltbevölkerung und die damit verbundene Nachfrage nach nachhaltigen, biobasierten Wertstoffen aus Bereichen wie der Pharmazie oder Lebensmittelproduktion, macht die Produktion solcher Wertstoffe mithilfe von Mikroorganismen zunehmend interessant und wichtig. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Algen für die Gewinnung von Vitamin B₉ genutzt werden können. Hierbei konnten durch eine folgende Betrachtung von Transkriptions- sowie Genomdaten Mechanismen identifiziert werden, welche für das Ein- und Ausschalten der Folatsynthesewege verantwortlich sind. Diese systembiologischen Daten könnten als Grundlage für eine gerichtete genetische Optimierung der Folatproduktion besonders im besten Produktionssystem (*Picochlorum sp.*) genutzt werden. Alternativ könnten gerichtete Mutationsverfahren wie chemische oder radiometrische Mutagenese eingesetzt werden, um die Folattiter weiter zu steigern. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass verschiedene Stressfaktoren sich negativ auf die Folatbildung auswirken können. Die gewonnenen Daten bilden die Basis für aufbauende Arbeiten wie z.B. Tests der Bioverfügbarkeit der gebildeten Vitamine für den Menschen. Um zukünftig neue, rentable Prozesse zu entwickeln, sollte die parallele Bildung von Vitamin B₉ und weiterer Koppelprodukte untersucht werden. Hierbei könnte die parallele Produktion von Lipiden und Vitamin B₉ von Interesse sein, da hierdurch die Rentabilität des Produktionsprozesses gesteigert werden könnte. Da Algen, wie in dieser Arbeit beschrieben, in der Lage sind, hohe Mengen an Vitamin B₉, Vitamin C und E zu bilden, sollte in Betracht gezogen werden, diese auf weitere Vitamine wie Vitamin B₆ hin zu analysieren.

Die gewonnenen Daten über die Proteinexpression durch *C. oleaginosus* bilden die Basis für ein systembiologisches Verständnis dieser oleogenen Hefe. Durch weiterführende Erkenntnisse im Bereich der Metabolomik könnten Stoffwechselwege aufgeklärt und so ein Model für *C. oleaginosus* entwickelt werden. Dieses könnte in Zukunft als Grundlage für die Erforschung weiterer Hefestämme dienen. Im Hinblick auf folgende Prozessoptimierungen könnte durch Implementierung weiterer oder neuer Promotoren gesteigerte Expressionen von Enzymen hervorgerufen werden, welche zu einer verbesserten Verstoffwechslung von Substraten wie Cellobiose führen könnten. Ebenfalls könnte, wie schon bei *S. cerevisiae* gezeigt, durch Einbringen neuer Gene die Nutzung weiterer Stoffe als Substrat für die Kultivierung von *C. oleaginosus* erreicht werden. Hierdurch könnten neue Prozesse, welche Abfallströme als Substrat nutzen würden, entwickelt und somit Prozesse rentabler gestaltet werden. Zusätzlich wären Produktoptimierungen möglich wie die Anpassung des Fettsäureprofils auf die jeweilige industrielle Nutzung.

Liste der Publikationen

Microalgae a superior source of folates: Quantification of folates in halophile microalgae by stable isotope dilution assay

Dirk Volker Woortman, **Tobias Fuchs**, Lisa Striegel, Monika Fuchs, Nadine Weber, Thomas B. Brück and Michael Rychlik

Original research article, Frontiers, Front. Bioeng. Biotechnol., Woortman et al. 2020

DOI: 10.3389/fbioe.2019.00481

Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology

Tobias Fuchs, Felix Melcher, Zora Rerop, Jan Lorenzen, Pariya Shaigani, Dania Awad, Martina Haack, Sophia Prem, Mahmoud Masri, Norbert Mehlmer, and Thomas B. Brueck

Original research article, Microbial Cell Factories, Fuchs et.al. 2021

DOI: 10.1186/s12934-021-01692-2

A newly designed automatically controlled, sterilizable flat panel photobioreactor for axenic algae culture

Tobias Fuchs, Nathanael D. Arnold, Daniel Garbe, Simon Deimel, Jan Lorenzen, Mahmoud Masri, Norbert Mehlmer, Dirk Weuster-Botz, Thomas B. Brueck

Brief research report article, Frontiers, Front. Bioeng. Biotechnol., Fuchs et al. 2021

Doi: 10.3389/fbioe.2021.697354

Sustainable production, characterization and application of a new exopolysaccharide secreted by *Chlorella sorokiniana*

Tobias Fuchs, Sandra Radziej, Paula Großmann, Moritz Kränzlein, Maria Bauer, Carolin Rickert, Ahmed Fahmy, Michael Paper, Jan Lorenzen, Mahmoud Masri, Martina Haack, Claudia Huber, Daniel Garbe, Norbert Mehlmer, Bernhard Rieger, Oliver Lieleg, Thomas Becker, Mario Jekle, Wolfgang Eisenreich, Thomas B. Brueck

Manuscript in Preparation für Nature Chemistry

Green Light illumination prompting new pigment formation

Matthias Glemser, Martina Haack, **Tobias Fuchs**, Daniel Garbe, Dirk Weuster-Botz,

Wolfgang Eisenreich, Thomas Brück

Manuscript in Preparation für Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

Elucidation of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* Lipogenesis via Time-resolved Proteomics and Metabolomics Approach

Dania Awad, Samer Younes, **Tobias Fuchs**, Martina Haack, Norbert Mehlmer, Thomas Brück

Manuscript in Preparation

6 Reprint Permission

Extract from the Frontiers Copyright Statement accessible from <https://www.frontiersin.org/legal/copyright-statement#> on the 11.10.2021 1200h:

“Frontiers publishes its own journals (referred to here as **Frontiers Journals**) and journals owned by third parties (referred to here as **Hosted Journals**). When we refer to **Journals**, we include both Frontiers Journals and Hosted Journals.

In this Copyright Statement, **Websites** (with a capitalised W) refers to all Frontiers websites, including those of Hosted Journals. An **Owner** means Frontiers as owner of all Frontiers Journals, or the respective owner of a Hosted Journal.

All content included on these Websites (including Loop), such as text, graphics, logos, button icons, images, video/audio clips, downloads, data compilations and software, is the property of the person or entity who or which owned it prior to submission to Frontiers or to a Hosted Journal. If not owned by Frontiers or an Owner of a Hosted Journal, it is licensed to Frontiers Media SA (“Frontiers”), such Owner or its or their licensees and/or subcontractors.

The ownership of copyright in the text of individual articles (including research articles, opinion articles, book reviews, conference proceedings and abstracts) is not affected by its submission to or publication by Frontiers, whether for itself or for a Hosted Journal. Frontiers benefits from a general licence over all content submitted. Hosted Journal Owners benefit from a general licence over all content submitted to their respective Hosted Journals. Frontiers, Hosted Journal Owners and all their users benefit from a Creative Commons CC-BY licence over all content, as specified below.

Images and graphics not forming part of user-contributed materials are the property of or are licensed to Frontiers and may not be downloaded or copied without Frontiers’ explicit and specific permission or in accordance with any specific copyright notice attached to that material.

The combination of all content on Frontiers websites, and the look and feel of the Frontiers websites, is the property of Frontiers Media SA.

As an author or contributor you grant permission to others to reproduce your articles, **including any graphics and third-party materials supplied by you**, in accordance with the Frontiers Terms and Conditions. The licence granted to third parties over all contents of each article, including third-party elements, is a Creative Commons Attribution (“CC BY”) licence. The current version is CC-BY, version 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and the licence will automatically be updated as and when updated by the Creative Commons organisation.

You may include a requirement to reproduce copyright notices but you may not restrict the right to reproduce the entire article, including third-party graphics. This means that you must obtain any necessary third-party consents and permissions to reproduce third-party materials in your articles submitted to Frontiers.

E-books are subject to the same licensing conditions as the articles within them.

Articles published prior to 25th May 2018: Please note that reproduction of third-party graphics and other third-party materials contained in articles published prior to 25th May 2018 may be subject to third-party notices prohibiting their reproduction without permission. You must comply with those notices.

Articles published prior to July 2012: The licence granted for these articles may be different and you should check the pdf version of any article to establish what licence was granted. If an article carries only a non-commercial licence and you wish to obtain a commercial licence, please contact Frontiers at editorial.office@frontiersin.org.

Article metadata, as defined in Frontiers' terms and conditions, are the property of Frontiers or the Owner of the respective Hosted Journal, and are licensed under Creative Commons CC0 terms.

All software used on this site, and the copyright in the code constituting such software, and all intellectual property in all such elements, is the property of or is licensed to Frontiers and its use is restricted in accordance with the Frontiers Terms and Conditions. All copyright, and all rights therein, are protected by national and international copyright laws.

Please also see the Frontiers Terms and Conditions.

Copyright Statement updated with effect from 16th December 2020.”

Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology

SPRINGER NATURE

Author: Tobias Fuchs et al

Publication: Microbial Cell Factories

Publisher: Springer Nature

Date: Oct 28, 2021

Copyright © 2021, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

CC0 applies for supplementary material related to this article and attribution is not required.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: AUFLISTUNG AUSGEWÄHLTER FETTSÄUREN, DIE IN MIKROORGANISMEN VORKOMMEN _____	2
TABELLE 2: ÜBERSICHT VON MIKROALGEN UND DEREN GEBILDETEN PRODUKTEN _____	9
TABELLE 3: ÜBERSICHT VON MIKROALGEN UND DEREN GEBILDETEN PRODUKTEN _____	10
TABELLE 4: ZUSAMMENSTELLUNG DES BOLD BASAL MEDIUMS _____	15
TABELLE 5: ZUSAMMENSTELLUNG DES YEAST NITROGEN BASE MEDIUMS _____	17

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATA DER GEWINNUNG VON HOCHWERTSTOFFEN AUS MIKROORGANISMEN.....	1
ABBILDUNG 2: AUFBAU EINES TRYGLYCERIDES.....	2
ABBILDUNG 3: AUFTEILUNG DER VITAMINE	4
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CO ₂ -LUBRICANTS PROJEKTES	6

8 Literaturverzeichnis

1. sunliquid®. Available at: <https://www.clariant.com/de/Business-Units/New-Businesses/Biotech-and-Biobased-Chemicals/Sunliquid>. (Accessed: 10th May 2021)
2. Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T. & Iefuji, H. Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **101**, 359–368 (2012).
3. Han, D., Li, Y. & Hu, Q. Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition* 388–405 (wiley, 2013). doi:10.1002/9781118567166.ch20
4. Lee, W. H. & Jin, Y. S. Improved ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutated cellobiose transporter during simultaneous saccharification and fermentation. *J. Biotechnol.* **245**, 1–8 (2017).
5. Lee, Y. G., Jin, Y. S., Cha, Y. L. & Seo, J. H. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* **228**, 355–361 (2017).
6. Hashem, M. & Darwish, S. M. I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* **34**, 953–959 (2010).
7. Mohd Azhar, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **10**, 52–61 (2017).
8. Hossain, N., Zaini, J. H. & Mahlia, T. M. I. A review of bioethanol production from plant-based waste biomass by yeast fermentation. *Int. J. Technol.* **8**, 5–18 (2017).
9. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology* **7**, 546 (2016).
10. Sitepu, I. R. *et al.* Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances* **32**, 1336–1360 (2014).
11. Biodieselproduktion: Genutzte Rohstoffe in EU bis 2020 | Statista. Available at: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1179109/umfrage/verbrauch-von-rohstoffen-zur-biodieselerzeugung-in-der-eu-nach-art/>. (Accessed: 16th March 2021)
12. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**, 294–306 (2007).
13. Kutty, S. N. & Philip, R. Marine yeasts—a review. *Yeast* **25**, 465–483 (2008).
14. Cavigelli, M. A., Robertson, G. P. & Klug, M. J. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant Soil* **170**, 99–113 (1995).
15. Masri, M. A., Garbe, D., Mehlmer, N. & Brück, T. B. A sustainable, high-performance process for the economic production of waste-free microbial oils that can replace plant-based equivalents. *Energy Environ. Sci.* **12**, 2717–2732 (2019).
16. Ali Salehi Sardoei, Azadeh Alizadeh & Alireza Khodabakhshzadeh. *Funktion von Vitaminen in Pflanzen*. (Verlag Unser Wissen, 2020).
17. Bässler, K. H. *Vitamine*. (Springer-Verlag, 2013).
18. Absatzveränderung ausgewählter Nahrungsergänzungsmittel in Deutschland 2018 | Statista. Available at: <https://de-statista-com.eaccess.ub.tum.de/statistik/daten/studie/1064734/umfrage/absatzveraenderung-ausgewaehelter-nahrungsergaenzungsmittel-in-deutschland/>. (Accessed: 17th March 2021)

19. Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P. & Spano, G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**, 1383–1394 (2012).
20. Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. The use of microorganisms in l-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.* **124**, 196–205 (2006).
21. Rosenberg, J., Ischebeck, T. & Commichau, F. M. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnol. Adv.* **35**, 31–40 (2017).
22. Fabregas, J. & Herrero, C. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J. Ind. Microbiol.* **5**, 259–263 (1990).
23. Branduardi, P. *et al.* Biosynthesis of Vitamin C by Yeast Leads to Increased Stress Resistance. *PLoS One* **2**, e1092 (2007).
24. Da, T. *et al.* 8 Secondary Metabolites.
25. Sekundärmetabolite - Lexikon der Biochemie. Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/sekundaermetabolite/5650>. (Accessed: 5th August 2021)
26. Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018 173 17**, 167–180 (2018).
27. Scientific Opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. *EFSA J.* **12**, (2014).
28. Mischko, W. *et al.* Modular biomanufacturing for a sustainable production of terpenoid-based insect deterrents. *Green Chem.* **20**, 2637–2650 (2018).
29. Ambati, R. R., Phang, S.-M., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Mar. Drugs* **2014, Vol. 12, Pages 128-152 12**, 128–152 (2014).
30. Harith, Z. T., Lima, M. de A., Charalampopoulos, D. & Chatzifragkou, A. Optimised Production and Extraction of Astaxanthin from the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microorg.* **2020, Vol. 8, Page 430 8**, 430 (2020).
31. Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* **67**, 696–701 (2006).
32. Rodolfi, L. *et al.* Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100–112 (2009).
33. Bernaerts, T. M. M. *et al.* Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res.* **32**, 150–161 (2018).
34. Endosymbiontentheorie - Kompaktlexikon der Biologie. Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/endosymbiontentheorie/3635>. (Accessed: 7th August 2021)
35. Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. & Takriff, M. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J. Biol. Res.* **21**, 6 (2014).
36. Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. & Prinsep, M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports* **37**, 175–223 (2020).
37. Usher, P. K., Ross, A. B., Camargo-Valero, M. A., Tomlin, A. S. & Gale, W. F. An

- overview of the potential environmental impacts of large-scale microalgae cultivation. *Biofuels* **5**, 331–349 (2014).
38. Romano, G. *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res.* **128**, 58–69 (2017).
 39. • Algae products: market value worldwide 2018-2025 | Statista. Available at: <https://www-statista-com.eaccess.ub.tum.de/statistics/1029897/market-size-algae-products-global/>. (Accessed: 6th April 2021)
 40. Levasseur, W., Perré, P. & Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances* **41**, 107545 (2020).
 41. Markou, G. & Nerantzis, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances* **31**, 1532–1542 (2013).
 42. Durmaz, Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* **272**, 717–722 (2007).
 43. Abe, K., Nishimura, N. & Hirano, M. Simultaneous production of β -carotene, vitamin E and vitamin C by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *J. Appl. Phycol.* **11**, 331–336 (1999).
 44. Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K. & Rashid, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **92**, 394–404 (2018).
 45. Lorenz, R. T. & Cysewski, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* **18**, 160–167 (2000).
 46. Schlipalius, L. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. *Bioresour. Technol.* **38**, 241–243 (1991).
 47. Pulz, O. & Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004 656** **65**, 635–648 (2004).
 48. Esquivel, M. G., Amaro, H. M., Pinto, T. S., Fevereiro, P. S. & Malcata, F. X. Efficient H₂ production via *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Biotechnol.* **29**, 595–600 (2011).
 49. Durmaz, Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* **272**, 717–722 (2007).
 50. Kim, S. M. *et al.* A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1843–1855 (2012).
 51. Feng, P., Deng, Z., Fan, L. & Hu, Z. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 405–410 (2012).
 52. Galadima, A. & Muraza, O. Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review. *Energy* **78**, 72–83 (2014).
 53. Nandy, S. K. & Srivastava, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiol. Res.* **207**, 83–90 (2018).
 54. Tamakawa, H., Mita, T., Yokoyama, A., Ikushima, S. & Yoshida, S. Metabolic

- engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013 97**, 6231–6239 (2013).
55. Chen, R., Yang, S., Zhang, L. & Zhou, Y. J. Advanced Strategies for Production of Natural Products in Yeast. *iScience* **23**, (2020).
 56. Cao, X. *et al.* Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnol. Biofuels* **2016 9**, 1–11 (2016).
 57. Krishna Leela, J. & Sharma, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Eng.* **2000 23**, 687–689 (2000).
 58. Bandhu, S., Srivastava, A., Ghosh, D. & Chaudhuri, T. K. Yeast Single Cell Oils from Bioresources: Current Developments in Production and Applications. *Curr. Sustain. Energy Reports* **2020 7**, 109–120 (2020).
 59. Patel, A. *et al.* An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms* **8**, 434 (2020).
 60. Awad, D., Bohnen, F., Mehlmer, N. & Brueck, T. Multi-Factorial-Guided Media Optimization for Enhanced Biomass and Lipid Formation by the Oleaginous Yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 54 (2019).
 61. van Maris, A. J. A. *et al.* Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* **2006 90**, 391–418 (2006).
 62. Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P. J., Rogers, P. & Stanley, G. A. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 139–149 (2010).
 63. Yamada, R., Wakita, K., Mitsui, R. & Ogino, H. Enhanced d-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2075–2084 (2017).
 64. Treichel, H., Oliveira, D. de, Mazutti, M. A., Luccio, M. Di & Oliveira, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol.* **2009 3**, 182–196 (2009).
 65. Khan, M. I., Shin, J. H. & Kim, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* **17**, 36 (2018).
 66. Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A. & Ibrahim, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **97**, 200–232 (2018).
 67. Binti Ibnu Rasid, E. N., Mohamad, S. E., Jamaluddin, H. & Salleh, M. M. Screening factors influencing the production of astaxanthin from freshwater and marine microalgae. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 2160–2174 (2014).
 68. Severes, A., Hegde, S., D'Souza, L. & Hegde, S. Use of light emitting diodes (LEDs) for enhanced lipid production in micro-algae based biofuels. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **170**, 235–240 (2017).
 69. Singh, S. P. & Singh, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **50**, 431–444 (2015).
 70. Lemoine, Y. & Schoefs, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* **106**, 155–177 (2010).

71. Yeesang, C. & Cheirsilp, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresour. Technol.* **102**, 3034–3040 (2011).
72. Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M. R. & Thevelein, J. M. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS yeast research* **17**, (2017).
73. Mozaffary, P., Milani, J. M. & Heshmati, A. The influence of yeast level and fermentation temperature on Ochratoxin A decrement during bread making. *Food Sci. Nutr.* **7**, 2144–2150 (2019).
74. Marienhagen, J. & Bott, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J. Biotechnol.* **163**, 166–178 (2013).
75. Jojima, T., Omumasaba, C. A., Inui, M. & Yukawa, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009 853 85**, 471–480 (2009).
76. Runquist, D., Fonseca, C., Rådström, P., Spencer-Martins, I. & Hahn-Hägerdal, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 123–130 (2009).
77. Zhao, C. *et al.* Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2181–2192 (2019).
78. Engineering yeast for efficient cellulose degradation - Van Rensburg - 1998 - Yeast - Wiley Online Library. Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980115\)14:1%3C67::AID-YEA200%3E3.0.CO;2-T](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1%3C67::AID-YEA200%3E3.0.CO;2-T). (Accessed: 8th July 2021)
79. Den Haan, R., Rose, S. H., Lynd, L. R. & van Zyl, W. H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **9**, 87–94 (2007).
80. Xu, Q. *et al.* Expression and secretion of fungal endoglucanase II and chimeric cellobiohydrolase I in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Microb. Cell Factories* **2017 161 16**, 1–16 (2017).
81. Bischoff, H. *Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*. (University of Texas, 1963).
82. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–858 (1996).
83. Granvogl, B., Gruber, P. & Eichacker, L. A. Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry. *Proteomics* **7**, 642–654 (2007).
84. Sandow, J. J., Infusini, G., Dagley, L. F., Larsen, R. & Webb, A. I. Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF Pro. *bioRxiv* 657908 (2019). doi:10.1101/657908
85. Meier, F. *et al.* Online parallel accumulation–serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 2534–2545 (2018).
86. Tran, N. H. *et al.* Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nat. Methods* **16**, 63–66 (2019).
87. Tran, N. H., Zhang, X., Xin, L., Shan, B. & Li, M. De novo peptide sequencing by deep

- learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 8247–8252 (2017).
88. Tran, N. H. *et al.* Complete de Novo Assembly of Monoclonal Antibody Sequences. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 89. Bateman, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**, D506–D515 (2019).
 90. Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343–350 (2011).
 91. Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L. & Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
 92. Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **30**, S162–S173 (2009).
 93. Studer, G. *et al.* QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **36**, 1765–1771 (2020).
 94. Bienert, S. *et al.* The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* **45**, D313–D319 (2017).
 95. Brennan, L. & Owende, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, 557–577 (2010).
 96. Ravindran, B. *et al.* Microalgae potential and multiple roles-current progress and future prospects-an overview. *Sustainability (Switzerland)* **8**, 1215 (2016).
 97. Schenk, P. M. *et al.* Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* **1**, 20–43 (2008).
 98. Vigani, M. *et al.* Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science and Technology* (2015). doi:10.1016/j.tifs.2014.12.004
 99. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. & Romano, P. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation* **4**, 38 (2018).
 100. Shin, Y. S. *et al.* Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology* **258**, 335–344 (2018).
 101. Wu, Y. H. *et al.* Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **33**, 675–688 (2014).
 102. Park, S., Nguyen, T. H. T. & Jin, E. S. Improving lipid production by strain development in microalgae: Strategies, challenges and perspectives. *Bioresource Technology* **292**, 121953 (2019).
 103. Gerpen, J. Van, Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D. & Knothe, G. Biodiesel Production Technology. (2004).
 104. Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* **25**, 743–756 (2013).
 105. Dickinson, S. *et al.* A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technol. Environ. Policy* **19**, 637–668 (2016).
 106. Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J. & Daroch, M. Astaxanthin-Producing Green

- Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front. Plant Sci.* **0**, 531 (2016).
107. Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L. & Chew, B. P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.* **7**, 1–10 (2010).
 108. Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. & Trenerry, C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* **11**, 247–255 (1999).
 109. Fujii, K., Nakashima, H. & Hashidzume, Y. Isolation of folate-producing microalgae, from oligotrophic ponds in Yamaguchi, Japan. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1421–1429 (2010).
 110. Feng, D., Chen, Z., Xue, S. & Zhang, W. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour. Technol.* **102**, 6710–6716 (2011).
 111. Woortman, D. V. *et al.* Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 481 (2020).
 112. Goiris, K. *et al.* Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Res.* **7**, 51–57 (2015).
 113. Ra, C. H., Kang, C. H., Kim, N. K., Lee, C. G. & Kim, S. K. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. *Renew. Energy* **80**, 117–122 (2015).
 114. El Arroussi, H., Benhima, R., Bennis, I., El Mernissi, N. & Wahby, I. Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. *Renew. Energy* **77**, 15–19 (2015).
 115. Mishra, A. & Jha, B. Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Bot. Mar.* **54**, 195–199 (2011).
 116. Chitlaru, E. & Pick, U. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **96**, 50–60 (1991).
 117. Thompson, G. A. Mechanisms of osmoregulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Exp. Zool.* **268**, 127–132 (1994).
 118. Brown, A. D., Lilley, R. M. C. & Marengo, T. Osmoregulation in *Dunaliella* Intracellular Distribution of Enzymes of Glycerol Metabolism. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **37**, 1115–1123 (1982).
 119. Goyal, A. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 705–710 (2007).
 120. Tammam, A. A., Fakhry, E. M. & El-Sheekh, M. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *dunaliella salina* and *dunaliella tertiolecta*. *African J. Biotechnol.* **10**, 3795–3808 (2011).
 121. Ringling, C. & Rychlik, M. Simulation of food folate digestion and bioavailability of an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate. *Nutrients* **9**, 1–19 (2017).
 122. Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. & Villadsen, J. Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation. *Metab. Eng.* **2**, 69–77 (2000).
 123. Kolouchová, I., Maťátková, O., Sigler, K., Masák, J. & Řezanka, T. Lipid accumulation

- by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol. (Praha)*. **61**, 431–438 (2016).
124. Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y. & Fujimori, K. E. Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* **8**, 139 (2018).
 125. Naghshbandi, M. P. *et al.* Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **115**, 109353 (2019).
 126. Tapia V, E., Anschau, A., Coradini, A. L., T Franco, T. & Deckmann, A. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB Express* **2**, 64 (2012).
 127. Tai, M. & Stephanopoulos, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* **15**, 1–9 (2013).
 128. Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L. & Lewis, D. A. Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 259–308 (1993).
 129. Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M. V. & Kaplan, J. CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 29515–29519 (2001).
 130. Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G. & Van Rensburg, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 182–190 (2001).
 131. Aung, H. W., Henry, S. A. & Walker, L. P. Revising the representation of fatty acid, glycerolipid, and glycerophospholipid metabolism in the consensus model of yeast metabolism. *Ind. Biotechnol.* **9**, 215–228 (2013).
 132. Klug, L. & Daum, G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Research* **14**, 369–388 (2014).
 133. Bracharz, F., Beukhout, T., Mehlmer, N. & Brück, T. Opportunities and challenges in the development of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a new cell factory for custom tailored microbial oils. *Microbial Cell Factories* **16**, 178 (2017).
 134. Pham, N. *et al.* Genome-scale metabolic modeling underscores the potential of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a cell factory for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* **14**, 1–17 (2021).
 135. Steyfkens, F., Zhang, Z., Van Zeebroeck, G. & Thevelein, J. M. Multiple transceptors for macro- and micro-nutrients control diverse cellular properties through the PKA pathway in yeast: A paradigm for the rapidly expanding world of eukaryotic nutrient transceptors up to those in human cells. *Frontiers in Pharmacology* **9**, (2018).
 136. Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J. & Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. in *FEMS Yeast Research* **8**, 1155–1163 (FEMS Yeast Res, 2008).
 137. Kawasse, F. M. *et al.* Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **25**, 371–375 (2003).
 138. Song, H. T., Jiang, Z. B. & Ma, L. X. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. *Protein Expr. Purif.* **47**, 393–397 (2006).
 139. Sassi, H. *et al.* Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate

- recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Factories* 2016 151 **15**, 1–11 (2016).
140. Galazka, J. M. *et al.* Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* (80-.). **330**, 84–86 (2010).
 141. Li, J. *et al.* Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 10479–10488 (2013).
 142. Lian, J., Li, Y., Hamedirad, M. & Zhao, H. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1521–1531 (2014).
 143. Dos Reis, T. F. *et al.* Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 204 (2016).
 144. Ouephanit, C., Boonvitthya, N., Theerachat, M., Bozonnet, S. & Chulalaksananukul, W. Efficient expression and secretion of endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* directed by the native and the preproLIP2 signal peptides. *Protein Expr. Purif.* **160**, 1–6 (2019).
 145. Idris, A., Tohda, H., Kumagai, H. & Takegawa, K. Engineering of protein secretion in yeast: Strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 403–417 (2010).
 146. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A. & Ghasemi, Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European Journal of Cell Biology* **97**, 422–441 (2018).
 147. Ha, S. J. *et al.* Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 504–509 (2011).
 148. Fuchs, T. *et al.* Identifying carbohydrate-active enzymes of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using systems biology. *Microb. Cell Fact.* **20**, 1–18 (2021).