



Technische
Universität
Braunschweig



Biotechnische Itaconsäureproduktion: Nutzung nachwachsender Rohstoffe und Prozessoptimierung

Susan Krull



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Biotechnische Itaconsäureproduktion:
Nutzung nachwachsender Rohstoffe und Prozessoptimierung





Biotechnische Itaconsäureproduktion: Nutzung nachwachsender Rohstoffe und Prozessoptimierung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Susan Krull
aus Köln



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliographische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2018

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2018

1. Referent: Professor a. D. Dr. Klaus-Dieter Vorlop

2. Referent: Professor Dr. Adrian Schumpe

eingereicht am: 04.12.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 09.03.2018

Druckjahr 2018

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,

Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2018

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2018

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier
aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9775-2

eISBN 978-3-7369-8775-3



Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, vorab in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, A., Prüße, U. (2017) Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. *Appl Microbiol Biot* 2017; 101: 4063–4072.

Krull, S., Eidt, L., Hevekerl, A., Kuenz, A. and Prüße, U. (2017) Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus*. *Process Biochem* 2017; 63: 169-176.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Krull, S., Eidt, L., Kuenz, A., Oetken, J., Storz, H. und Prüße, U. (2016), Biotechnologisch erzeugte Itaconsäure aus agrarischen Reststoffen. *ProcessNet-Jahrestagung 2016 und 32. Jahrestagung der Biotechnologen. Chem Ing Tech*, 88(9): 1232



Poster

Krull, S., Brockmann, A., Hevekerl, A., Kuenz, A., Prübe, U. and Vorlop K.-D. (2015), Biotechnological itaconic acid production from hydrolysates. 3rd European Congress of Applied Biotechnology

Krull, S., Eidt, L., Hevekerl, A., Kuenz, A., Oetken, J., Storz, H. and Prübe, U. (2016), Biotechnological itaconic acid production from wheat chaff hydrolysate. 12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries

Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, Prübe, U. and Vorlop, K.-D. (2016), High itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. 12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries

Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, Prübe, U. und Vorlop, K.-D. (2016), Biotechnologische Itaconsäureproduktion: Prozessoptimierung und Scale-up. ProcessNet-Jahrestagung 2016 und 32. Jahrestagung der Biotechnologen. Chem Ing Tech, 88(9): 1239



Nach Einreichen der Dissertation und Abschluss des Prüfungsverfahrens erfolgte eine weitere Veröffentlichung:

Kuenz, A. and Krull, S. (2018) Biotechnological production of itaconic acid — things you have to know. *Appl Microbiol Biot* 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8895-7>





Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theorie	3
2.1	Biomasse	3
2.1.1	Lignocellulose	3
2.1.2	Weizenkaff	5
2.2	Biokonversion	5
2.2.1	Vorbehandlung	6
2.2.2	Enzymatische Hydrolyse	7
2.2.3	Prozesskonfiguration	9
2.3	Itaconsäure	11
2.3.1	Itaconsäureproduktion und Anwendungen	12
2.3.2	Itaconsäureproduzenten	13
2.4	<i>Trichocomaceae</i>	15
2.4.1	Stoffwechselweg	16
2.4.2	Morphologie	17
2.4.3	Substrate	18
2.4.4	pH-Wert	19
2.5	<i>Ustilaginaceae</i>	20
2.5.1	Stoffwechselweg	20
2.5.2	Morphologie	21



3	Material und Methoden	22
3.1	Kultivierung von <i>Trichocomaceae</i>	22
3.1.1	Herstellung einer Sporensuspension aus Oberflächenkulturen und Stammhaltung	22
3.1.2	Herstellung einer Sporensuspension aus Submerskulturen .	23
3.1.3	Bestimmung der Sporenkonzentration	24
3.1.4	Mediumzusammensetzung	24
3.1.5	Kultivierung in Schüttelkolben	25
3.1.6	Kultivierung in Mikrotiterplatten	25
3.1.7	Kultivierung im 1,5 L-Rührreaktor	26
3.1.8	Kultivierung im 15 L-Rührreaktor	27
3.1.9	Probennahme und Aufarbeitung	29
3.2	Kultivierung von <i>Ustilaginaceae</i>	30
3.2.1	Stammhaltung	30
3.2.2	Mediumzusammensetzung	31
3.2.3	Kultivierung in Reagenzgläsern	32
3.2.4	Kultivierung in Schüttelkolben	32
3.2.5	Probennahme und Aufarbeitung	33
3.3	Weizenkaff	33
3.3.1	Bestimmung der Weizenkaffzusammensetzung	33
3.3.2	Vorbehandlung	34
3.3.3	Enzymatische Hydrolyse	35
3.3.4	Eindampfen und Aufreinigung des Weizenkaffhydrolysats .	35
3.3.5	Simultane Verzuckerung und Fermentation	36
3.3.6	Separate Verzuckerung und Fermentation	36
3.4	Analytische Methoden	37
3.4.1	Fettsäurebestimmung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Koppelung	37
3.4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	38
3.4.3	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepul- ster amperometrischen Detektion	39
3.4.4	Ionenchromatographie	40
3.4.5	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma	40



3.4.6	Bestimmung der Cellulaseaktivität	42
3.4.7	Bestimmung von Glucoseäquivalenten mittels DNS-Reagenz	42
3.4.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.4.9	Mikroskopie	44
3.4.10	Bestimmung der Dissoziationskonstanten	44
3.5	Datenauswertung	45
4	Ergebnisse und Diskussion	46
4.1	Itaconsäureproduktion auf Basis von Lignocellulose	46
4.1.1	Screening nach alternativen Itaconsäurebildnern	46
4.1.2	Verwertung von Monosacchariden aus lignocellulosehaltiger Biomasse	50
4.1.2.1	Zuckerverwertung <i>U. maydis</i>	50
4.1.2.2	Zuckerverwertung <i>U. rabe</i> <i>horstiana</i>	52
4.1.2.3	Zuckerverwertung <i>A. terreus</i>	55
4.1.2.4	Zuckerverwertung - Vergleich	57
4.1.3	Einfluss von typischen Nebenprodukten aus der Lignocellulose-Vorbehandlung auf die Itaconsäureproduktion	58
4.1.3.1	Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf <i>U. maydis</i>	58
4.1.3.2	Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf <i>U. rabe</i> <i>horstiana</i>	60
4.1.3.3	Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf <i>A. terreus</i>	61
4.1.3.4	Einflüsse von Nebenprodukten der Vorbehandlung - Vergleich	65
4.1.4	Einfluss der Enzymformulierung	67
4.1.4.1	Einfluss der Enzymformulierung <i>U. maydis</i> . . .	68
4.1.4.2	Einfluss der Enzymformulierung <i>U. rabe</i> <i>horstiana</i>	69
4.1.4.3	Einfluss der Enzymformulierung auf <i>A. terreus</i> .	70
4.1.4.4	Einfluss der Enzymformulierung - Vergleich . . .	71
4.1.5	Synthetisches Weizenkaffhydrolysat	71
4.1.5.1	Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - <i>U. maydis</i> .	72
4.1.5.2	Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - <i>U. rabe</i> <i>horstiana</i>	73
4.1.5.3	Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - <i>A. terreus</i> .	75



4.1.5.4	Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - Vergleich	78
4.1.6	Auswahl eines Mikroorganismus zur Kultivierung auf Weizenkaffhydrolysat	79
4.2	Itaconsäureproduktion mit <i>A. terreus</i> auf Weizenkaffhydrolysat	81
4.2.1	Charakterisierung des Weizenkaffs	81
4.2.2	Alkalische Vorbehandlung des Weizenkaffs	83
4.2.3	Simultane Verzuckerung und Fermentation mit alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff	85
4.2.4	Separate Hydrolyse und Fermentation mit alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff	88
4.2.4.1	Enzymatische Hydrolyse von Weizenkaff	88
4.2.4.2	Biokonversion von Weizenkaffhydrolysat	90
4.2.4.3	Biokonversion von konzentriertem Weizenkaffhydrolysat	92
4.2.4.4	Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungsoptionen	94
4.2.4.5	Bestimmung der kritischen Ionenkonzentrationen im Hydrolysat	95
4.2.4.6	Kultivierung mit aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat	97
4.2.5	Prozessüberblick: Itaconsäure aus Weizenkaff	98
4.2.6	Vergleich der Kultivierungen auf Weizenkaffhydrolysat mit Glucose	101
4.2.7	Vergleich mit der Literatur	102
4.3	Itaconsäureproduktion auf Basis von Glucose mit <i>A. terreus</i>	107
4.3.1	Referenzkultivierungen im 1,5 L-Rührreaktor	107
4.3.1.1	Kultivierung ohne pH-Kontrolle	107
4.3.1.2	Kultivierung mit pH-Kontrolle	109
4.3.2	Korrekturmittel	110
4.3.3	Startpunkt der pH-Kontrolle	112
4.3.4	Einfluss des pH-Wertes	114
4.3.4.1	Kultivierung mit pH-Kontrolle bei pH 3,4	116
4.3.4.2	Dissoziationsgrad von Itaconsäure	118
4.3.4.3	Bestimmung der Konzentrationen von Itaconsäure und Itaconaten in der Fermentationsbrühe	119
4.3.5	Einfluss von Phosphat	121
4.3.6	Einfluss von Mangan	123



4.3.7	Kultivierung im 15 L-Rührreaktor	124
4.3.8	Vergleich der Kultivierungen mit der Literatur	128
5	Zusammenfassung und Ausblick	132
	Literaturverzeichnis	136
	Anhang	152
A	Verzeichnisse und Listen	152
A.1	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	153
A.2	Chemikalienliste	156
A.3	Geräteliste	159
B	Analysenergebnisse	161
B.1	Synthetische Hydrolysate	161
B.2	Fettsäuren	163
B.3	Ammoniaklösungen	164
	Danksagung	165



Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau von Lignocellulose, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin.	4
2.2	Schematische Darstellung einer Lignocellulosevorbehandlung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse.	6
2.3	Schematische Darstellung einer Cellulosehydrolyse mittels Endo- und Exoglucanase, sowie β -Glucosidase.	8
2.4	Schematische Darstellung unterschiedlicher Prozessstrategien für die Biokonversion.	10
2.5	Strukturformel der Itaconsäure und die Möglichkeit der Polykondensation.	11
2.6	Konidienträger von <i>A. terreus</i> und Pelletwachstum in Submerskultivierung.	15
2.7	Schematischer Biosyntheseweg von Itaconsäure in <i>A. terreus</i> und Gleichgewicht der schwachen Säuren im Medium und Cytoplasma.	16
2.8	Schematische Darstellung der Wachstumsformen von <i>U. maydis</i> und mikroskopische Aufnahme einer Vorkultur von <i>U. maydis</i>	20
3.1	Schematische Darstellung des 1,5 L-Rührreaktors mit Maßen.	26
3.2	Schematische Darstellung des 15 L-Rührreaktor mit Maßen.	28
4.1	A - Mikroskopische Aufnahmen von <i>U. maydis</i> DSM 17144, B - Gefärbte Probe mit Nilrot, Lipideinschlüsse leuchten hellrot, kultiviert in Reagenzgläsern 125 rpm, 30 °C, 4 d, 400-fach vergrößert.	48



4.2	Konzentrationen der organischen Säuren und Zuckeralkohole, sowie erzielte Itaconsäureausbeute beim Screening unterschiedlicher Hefen mit Tabuchi-Medium und Glucose als Substrat. Kultiviert in Reagenzgläsern bei 125 rpm, 30 °C, 4 d.	49
4.3	Übersicht der Morphologie von <i>U. maydis</i> auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO ₃ , 200-fach vergrößert.	51
4.4	Vergleich von Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von <i>U. maydis</i> auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO ₃	52
4.5	Übersicht der Morphologie von <i>U. rabenhorstiana</i> auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO ₃ , 200-fach vergrößert, Galactose 400-fach vergrößert.	53
4.6	Vergleich von Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von <i>U. rabenhorstiana</i> auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO ₃	54
4.7	Übersicht der Morphologie von <i>A. terreus</i> auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in einer 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 33 °C, Start-pH 3,1, ungerichtet, 100-fach vergrößert.	55
4.8	Vergleich der Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von <i>A. terreus</i> nach 4 Tagen auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in einer 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 33 °C, Start-pH 3,1, ungerichtet.	56
4.9	Einfluss von schwachen Säuren und Furanderivaten auf die Produktivität von Itaconsäure mit <i>U. maydis</i> in Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 6,7 nach 4 Tagen.	59
4.10	Einfluss von schwachen Säuren und Furanderivaten auf die Produktivität von Itaconsäure mit <i>U. rabenhorstiana</i> in Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 6,7 nach 4 Tagen.	60
4.11	Einfluss von schwachen Säuren und Furanderivaten auf die Produktivität von Itaconsäure mit <i>A. terreus</i> in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen.	62
4.12	Einfluss von schwachen Säuren auf die Morphologie und das Wachstum von <i>A. terreus</i> in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen, 100-fach vergrößert.	63



4.13	Einfluss von Furanderivaten auf die Morphologie und das Wachstum von <i>A. terreus</i> in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen, 100-fach vergrößert.	64
4.14	Vergleich des Einflusses auf die Itaconsäureproduktivität durch Zugabe von Ameisensäure oder Furfural von <i>A. terreus</i> , <i>U. maydis</i> und <i>U. rabehorstiana</i> . Normiert auf die Produktivität ohne Zusatz von Inhibitoren.	66
4.15	Einfluss des Enzympräperates Biogazyme 2x auf die Itaconsäureproduktivität mit <i>A. terreus</i> in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm und <i>U. maydis</i> sowie <i>U. rabehorstiana</i> in schräg geschüttelten Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm nach 3,8 Tagen. . .	69
4.16	Kultivierung von <i>U. maydis</i> in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 30 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.	72
4.17	Kultivierung von <i>U. rabehorstiana</i> in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 30 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.	74
4.18	Kultivierung von <i>A. terreus</i> in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 33 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.	75
4.19	Morphologie von <i>A. terreus</i> nach 3 Tagen Kultivierung bei 33 °C und 120 rpm in Schüttelkolben auf A - Glucose, B - synthetischem Weizenkaffhydrolysat, C - synthetischem Pappelholzhydrolysat, D - synthetischem Fichtenholzhydrolysat und E - synthetischem Orangenschalenhydrolysat, 200-fach vergrößert.	77
4.20	Aussehen des verwendeten Weizenkaffs in den unterschiedlichen Schritten der Vorbehandlung. A - unbehandeltes Weizenkaff, B - mechanisch zerkleinertes Weizenkaff, C - Weizenkaff nach der alkalischen Vorbehandlung, D - vorbehandeltes und gewaschenes Weizenkaff, E - getrocknetes Weizenkaff nach allen Vorbehandlungsschritten.	83



4.21	A - Überstand der alkalischen Vorbehandlung von Weizenkaff nach drei Tagen mit 0,25 M NaOH bei Raumtemperatur, B bis E - Überstände der durchgeführten Waschschr	84
4.22	A - Simultane Verzuckerung von 10 % (w/v) alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff mit 10 FPU/g _{Biomasse} Biogazyme 2x und Fermentation mit <i>A. terreus</i> in 250 mL Schüttelkolben bei 33 °C, 120 rpm und Start-pH-Wert von pH 3,1. B - Aufnahme des Schüttelkolbens nach 5 Tagen Kultivierung und C - Mikroskopische Aufnahme bei 50-facher Vergrößerung.	86
4.23	Enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff im Schüttelkolben mit 10 FPU/g _{Biomasse} Biogazyme 2x. Feststoffanteil 10 % (w/v), pH 4,8, 50 °C und 120 rpm.	89
4.24	A - Beginn der Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff, B - Weizenkaffhydrolysat nach 6,6 Tagen mit Biogazyme 2x bei 50 °C und pH 4,8, C - Weizenkaffhydrolysat nach der Abtrennung des nicht-hydrolysierten Weizenkaffs, D - konzentriertes Weizenkaffhydrolysat.	90
4.25	Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierung im Schüttelkolben von <i>A. terreus</i> bei 33 °C und 120 rpm nach 4 Tagen. A - mit Glucose, B - Weizenkaffhydrolysat C - Weizenkaffhydrolysat ohne Reststoffe; 50-fach vergrößert.	91
4.26	Kultivierung von <i>A. terreus</i> bei 33 °C und 120 rpm im Schüttelkolben mit Weizenkaffhydrolysat. Die gestrichelte Linie stellt die maximal erzielte Itaconsäurekonzentration da, die mit dem entsprechenden synthetischen Hydrolysat erzielt wurde.	93
4.27	Kultivierung von <i>A. terreus</i> bei 33 °C und 950 rpm in Mikrotiterplatten mit aufkonzentrierten Weizenkaffhydrolysat, behandeltes Weizenkaffhydrolysat mit Aktivkohle, mit Kationentauscher und mit Aktivkohle und Kationentauscher.	94
4.28	Kultivierung von <i>A. terreus</i> bei 33 °C und 120 rpm im Schüttelkolben mit aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat mittels Kationentauscher. Die gestrichelte Linie stellt die maximal erzielte Itaconsäurekonzentration da, die mit dem entsprechenden synthetischen Hydrolysat erzielt wurde.	97
4.29	Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierung im Schüttelkolben von <i>A. terreus</i> bei 33 °C und 120 rpm nach 4 Tagen. A - mit Glucose, B - gereinigtem Weizenkaffhydrolysat C - synthetischem Weizenkaffhydrolysat; 200-fach vergrößert.	98
4.30	Zusammenfassung des entwickelten Prozesses zur Herstellung eines Hydrolysats auf Basis von Weizenkaff und anschließender Biokonversion mit <i>A. terreus</i> zu Itaconsäure.	99



4.31	Referenzkultivierung mit <i>A. terreus</i> ohne pH-Kontrolle in einem 1,5 L-Rührreaktor mit der sich einstellenden Morphologie (200-fach vergrößert) mit 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.	108
4.32	Referenzkultivierung mit <i>A. terreus</i> mit pH-Kontrolle nach 2 Tagen auf pH 3 mit einer 6,25 % Ammoniaklösung in einem 1,5 L-Rührreaktor der sich einstellenden Morphologie (200-fach vergrößert) mit 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.	109
4.33	Einfluss unterschiedlicher 6,25 % Ammoniaklösungen als Korrekturmittel für die pH-Korrektur auf die Itaconsäureproduktion und Morphologie. 1,5 L-Rührreaktor mit einem Start-pH von pH 3,1 und pH-Kontrolle nach 1,8 Tagen auf pH 3, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Der Pfeil markiert den Startzeitpunkt der pH-Kontrolle. Morphologie von <i>A. terreus</i> nach 2,7 Tagen A - Ammoniaklösung mit der Reinheit ultra trace von Fluka, B - Ammoniaklösung mit der Reinheit Rotipuran p.a. von Carl Roth und C - Ammoniaklösung mit der Reinheit ACS Reagenz von Sigma-Aldrich, jeweils 200-fach vergrößert.	111
4.34	Einfluss des Startzeitpunkts der pH-Kontrolle auf die Itaconsäureproduktion mit <i>A. terreus</i> auf pH 3 mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) in einem 1,5 L-Rührreaktor mit einem Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Die Pfeile markieren den Startzeitpunkt der pH-Kontrolle.	113
4.35	Einfluss der pH-Kontrolle in der Produktionsphase von <i>A. terreus</i> auf Endtiter, Produktivität, Ausbeute und BTM-Konzentration. Der pH-Wert wurde nach 2 Tagen mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) in einem 1,5 L-Rührreaktor auf den jeweiligen pH-Wert angehoben und geregelt. Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, Fed-Batch mit Glucose, 450 rpm und 35 °C.	115
4.36	Kultivierung von <i>A. terreus</i> in einem 1,5 L-Rührreaktor als Fed-Batch mit Glucose. Der pH-Wert wurde nach zwei Tagen mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3,4 angehoben und geregelt. Der Pfeil symbolisiert den Beginn der pH-Kontrolle. Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.	117
4.37	Bestimmte relative Verteilung von Itaconsäure und Itaconaten als Funktion des pH-Wertes in der Fermentationsbrühe bei 35 °C.	118
4.38	Endtiter der Itaconsäure basierend auf den kalkulierten Anteilen von H_2IA und HIA^-	119



- 4.39 Vergleich der Kultivierung von *A. terreus* mit 0,1 g/L und 0,8 g/L KH_2PO_4 in einem 1,5 L-Rührreaktor als Fed-Batch mit Glucose. Der pH-Wert wurde mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3,4 angehoben und geregelt. Start-pH von pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Die Pfeile symbolisieren den Beginn der pH-Kontrolle. . . . 122
- 4.40 Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierungen von *A. terreus* bei 35 °C nach 3 Tagen mit 200-facher Vergrößerung. A - 15 L-Rührreaktor mit 0,8 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3,4, B - 1,5 L-Rührreaktor mit 0,1 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3, C - 15 L-Rührreaktor mit 0,1 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3. Start-pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, 1,5 L-Reaktor: min. DO 25 %, 450 rpm und 15 L-Reaktor: min. DO 20-25 %, 350 rpm. 125
- 4.41 Vergleich der Kultivierung in einem 15 L-Rührreaktor und einem 1,5 L-Rührreaktor von *A. terreus* mit 0,1 g/L KH_2PO_4 . Der pH-Wert wurde nach 2 Tagen mit einer 25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3 angehoben und geregelt. Start-pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, 35 °C, 1,5 L-Reaktor: min. DO 25 %, 450 rpm und 15 L-Reaktor: min. DO 20-25 %, 350 rpm. Der Pfeil symbolisiert den Beginn der pH-Kontrolle. 126
- 4.42 Vergleich einer typischen industriellen Citronensäureproduktion mit *A. niger* nach Roehr et al. (1996) und die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* dieser Arbeit in einem 15 L-Rührreaktor. 130



Tabellenverzeichnis

2.1	Wichtige Eigenschaften der Itaconsäure.	11
2.2	Übersicht über natürliche und genetisch veränderte Organismen zur Itaconsäureproduktion.	14
3.1	Zusammensetzung des Czapek-Dox-Agars nach Hevekerl (2016).	23
3.2	Standardproduktionsmedium zur Kultivierung von <i>A. terreus</i>	25
3.3	Verwendete Module von DASGIP (Eppendorf GmbH, Jülich) für die Kultivierung im 1,5 L-Bioreaktor zur Regelung und Datenaufzeichnung.	27
3.4	Zusammensetzung des YEPS-Mediums und -Agarplatten.	31
3.5	Tabuchi-Medium zur Kultivierung der Hefen nach Guevarra and Tabuchi (1990).	32
3.6	Geräte des HPLC-Systems.	38
3.7	Geräte des HPAEC-PAD-Systems Dionex ICS 5000 von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA).	39
3.8	Gradient des Eluenten zur Bestimmung der Monosaccharidkonzentrationen mittels HPAEC-PAD.	39
3.9	Parameter zur Bestimmung von Kationen und Anionen mittels Dionex ICS-100 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).	40
3.10	Ermittelte Elemente mittels ICP-OES mit zugehöriger Wellenlänge und Messmodus.	41
3.11	Herstellung von Blanks und Standards in 0,05 M Natriumacetatpuffer zur Bestimmung der Cellulaseaktivität.	42
3.12	Zusammensetzung der DNS-Reagenz.	43



4.1	Screeningübersicht über die Produktion von Itaconsäure, Malat, Succinat und Erythrit nach 4 Tagen und 30 °C mit Tabuchi-Medium und Glucose als Substrat.	47
4.2	Vergleich der Zuckerverwertung von <i>A. terreus</i> , <i>U. rabenhorstiana</i> und <i>U. maydis</i> nach 4 Tagen bezogen auf die Itaconsäureproduktivität mit Glucose.	57
4.3	Konzentrationen unterschiedlicher Elemente der Enzymmischung Biogazyme 2x.	68
4.4	Vergleich der Kultivierung von <i>A. terreus</i> auf synthetischen Hydrolysaten in Schüttelkolben bei 33 °C und 120 rpm mit der Kultivierung auf reiner Glucose. Die Gesamtkonzentration der Monosaccharide betrug 100 g/L zu Beginn der Kultivierung.	76
4.5	Vergleich der Kultivierung von <i>A. terreus</i> , <i>U. maydis</i> und <i>U. rabenhorstiana</i> auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat in Schüttelkolben bei 33 °C bzw. 30 °C und 120 rpm.	78
4.6	Vor- und Nachteile der itaconsäureproduzierenden Mikroorganismen <i>A. terreus</i> , <i>U. maydis</i> und <i>U. rabenhorstiana</i> auf der Basis der durchgeführten Versuche zur Nutzung von Weizenkaffhydrolysat als Substrat. + Vorteil, ~ neutral, - Nachteil.	80
4.7	Ermittelte Zusammensetzung von Weizenkaff durch eine zweistufige Säurehydrolyse nach Sluiter et al. (2008) im Vergleich zur Literatur in g/g.	82
4.8	Konzentrationen unterschiedlicher Elemente im Medium und in den aufgereinigten Hydrolysaten mit Aktivkohle (A), Kationentauscher (K) und einer zweistufigen Aufreinigung mit Aktivkohle und Kationentauscher (A+K).	96
4.9	Vergleich der Kultivierungen mit <i>A. terreus</i> in Schüttelkolben nach 7,7 Tagen bei 33 °C und 120 rpm auf den Substraten Glucose, synthetischem Weizenkaffhydrolysat, gereinigtem Weizenkaffhydrolysat und Weizenkaffhydrolysat mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 85 g/L.	101
4.10	Literaturvergleich von Kultivierungen mit <i>A. terreus</i> mit Hydrolysaten auf Basis von Lignocellulose.	106
4.11	Vergleich des Fed-Batchs mit Standard-Glucose und gereinigter Glucose von <i>A. terreus</i> im 1,5 L-Rührreaktor bei 35 °C, 450 rpm und 0,1 g/L KH ₂ PO ₄ nach 11,8 Tagen.	125
4.12	Vergleich der Ergebnisse zur Itaconsäureproduktion mit Glucose in Rührkesselreaktoren und einer pH-Kontrolle in der fortgeschrittenen Produktionsphase.	129
4.13	Vergleich der erzielten Ergebnisse mit Ergebnissen in Reaktoren aus der Literatur.	131





KAPITEL 1

Einleitung und Zielsetzung

Erdöl zählt zu den wichtigsten Energieträgern weltweit und ist zudem der meist verwendete Rohstoff für die chemische Industrie. Aufgrund der Endlichkeit dieses fossilen Rohstoffes, eines steigenden Umweltbewusstseins, einem stetigen Bevölkerungswachstum und somit einer steigenden Nachfrage an Energie, Rohstoffen und Nahrungsmitteln, muss eine Umstellung auf erneuerbare und nachwachsende Ressourcen erfolgen.

Gerade die Polymerchemie basiert weitestgehend auf Erdöl. Eine umweltverträglichere Herstellung von chemischen Grundstoffen für Kunststoffe bieten u. a. biotechnologische Verfahren. Im biotechnologischen Bereich werden zur Herstellung dieser Grundstoffe häufig reine Zucker in Form von Glucose oder Saccharose verwendet, um hohe Titer und Produktivitäten erzielen zu können. Dabei basiert Glucose meist auf Stärkehydrolysaten aus Mais, Kartoffeln oder Weizen und zur Saccharoseproduktion werden Zuckerrohr oder Zuckerrübe verwendet. Alle diese verwendeten Rohstoffe und die dafür genutzten landwirtschaftlichen Flächen stehen daher in Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Alternativ können nachwachsende ungenutzte landwirtschaftliche Nebenprodukte und Reststoffe für biotechnologische Verfahren genutzt werden, wie beispielsweise Weizenkaff, Stroh oder Abfälle aus der Lebensmittelweiterverarbeitung. Diese Biomasse ist größtenteils CO₂-neutral, kostengünstig und steht nicht in Konkurrenz mit der Nahrungs- oder Futtermittelindustrie.



Itaconsäure zählt zu den chemischen Grundstoffen für die Polymerindustrie, die auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wird Itaconsäure biotechnologisch mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus terreus* industriell hergestellt. Die Nachfrage für die organische Säure ist aufgrund der hohen Produktionskosten im Vergleich zu alternativen petrochemisch hergestellten Grundstoffen gering. Die hohen Produktionskosten begründen sich auf einem niedrigen Titer von etwa 90 g/L (Batti and Schweiger, 1963; Kuenz et al., 2012). Zwar konnte die Endkonzentration im Labormaßstab auf 129 g/L gesteigert werden (Hevekerl et al., 2014b), dieser Titer liegt aber immer noch deutlich unter dem Titer der vergleichbaren industriellen Produktion von Citronensäure mit *Aspergillus niger* mit durchschnittlich 200 g/L (Roehr et al., 1996). Zusätzlich basiert die Itaconsäureproduktion auf der Nutzung reiner Zucker, aufgereinigten Melassen oder Stärkehydrolysaten, da der Pilz sehr sensitiv auf Störstoffe im Kultivierungsmedium reagiert. Somit stellt der Einsatz von nachwachsenden agrarischen Reststoffen neue Herausforderungen in der Prozessführung und Kultivierung des sehr empfindlichen filamentösen Pilzes *Aspergillus terreus*. Es sind jedoch auch robustere Mikroorganismen, wie *Ustilago maydis*, in der Lage, die organische Säure zu bilden. Aufgrund von zu geringen Titern und Produktivitäten werden diese Mikroorganismen industriell nicht genutzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Itaconsäureproduktion basierend auf nachwachsenden Reststoffen unterschiedlicher Mikroorganismen mit *Aspergillus terreus* zu vergleichen und die Vor- und Nachteile der einzelnen Organismen herauszuarbeiten. Dazu soll eine systematische Studie durchgeführt und die unterschiedlichen Störstoffe aus Hydrolysaten und deren Effekt auf die Itaconsäureproduktion beschrieben werden. Abschließend soll der effektivste Organismus ausgewählt, unterschiedliche Kultivierungsstrategien und Aufreinigungsverfahren miteinander verglichen und die Itaconsäureproduktion auf Basis agrarischer Reststoffe optimiert werden.

Neben der Produktion von Itaconsäure auf alternativen nachwachsenden Rohstoffen, soll auch die Kultivierung von *Aspergillus terreus* auf reinem Zucker weiter untersucht werden, um den Titer zu erhöhen. Um das mögliche Potenzial der Itaconsäureproduktion mit diesem Organismus aufzuzeigen und die Beeinflussung durch Störstoffe zu verringern, soll Glucose verwendet werden. Speziell soll dazu der Einfluss des pH-Wertes auf die Kultivierung untersucht und nach der Prozessoptimierung die Kultivierung in einen größeren Maßstab überführt werden.



KAPITEL 2

Theorie

2.1 Biomasse

Als Biomasse wird das gesamte organische Material bezeichnet, welches von Pflanzen und Tieren erzeugt wird (Geitmann, 2005). Dabei beläuft sich die jährliche weltweite Produktion auf etwa $146 \cdot 10^9$ bis $170 \cdot 10^9$ Tonnen (Eggersdorfer et al., 1992; Demirbaş, 2001). Schätzungsweise sind davon $245 \cdot 10^6$ Tonnen nicht genutzte agrarische Reststoffe, die nicht mit der aktuellen Lebens- und Futtermittelherstellung konkurrieren (Perlack et al., 2011) und könnten daher als alternative nachwachsende Polysaccharide in vielen biotechnologischen Anwendungen genutzt werden.

2.1.1 Lignocellulose

Die Biomasse photosynthesebetreibender Pflanzen besteht größtenteils aus Lignocellulose. Diese setzt sich aus den drei Hauptbestandteilen Cellulose (30–50 %), Hemicellulose (20–35 %) und Lignin (10–25 %) zusammen (Lynd et al., 2002; Rowell, 2012). Die genaue prozentuale Zusammensetzung hängt jedoch von der jeweiligen Pflanzenart und Umweltfaktoren ab.

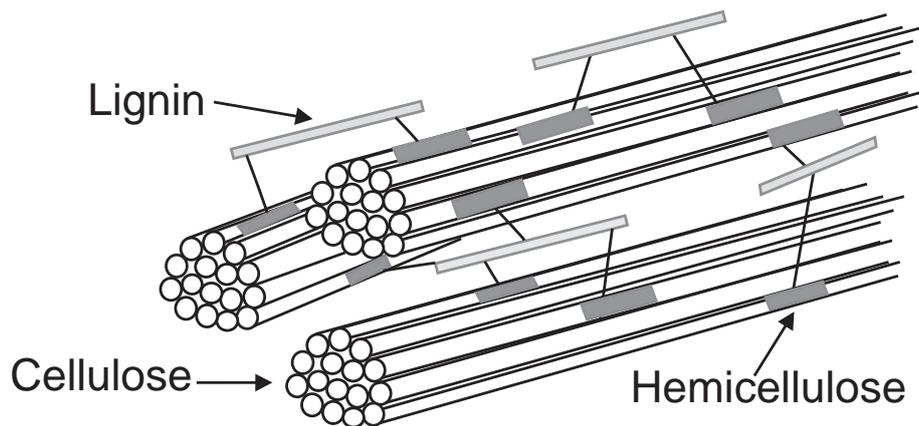


Abbildung 2.1 – Schematischer Aufbau von Lignocellulose, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin (modifiziert nach Lee and Shah (2012)).

Lignocellulose besteht aus unelastischen Cellulosefibrillen, die in eine vernetzte Struktur aus Lignin und Hemicellulose eingelagert sind (Lee and Shah, 2012) (Abbildung 2.1).

Die Cellulosefibrillen bestehen aus einer Vielzahl an parallel angeordneten Cellulosesträngen, die Polymere aus Glucose-Monomeren sind. Die Monomere sind über β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft, gegeneinander um 180° gedreht und bilden so eine lineare, unverzweigte Kette aus (Lynd et al., 1999; Wyman et al., 2005). Die Celluloseketten sind durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte verbunden (Pizzi and Eaton, 1985) und bilden so eine dichte, kristalline Packung aus, welche nur sehr schwierig in ihre Monomere zerlegt werden kann (Dadi et al., 2006). Diese kristallinen Bereiche werden durch ungeordnete, amorphe Bereiche regelmäßig unterbrochen.

Hemicellulose ist ein amorphes Polysaccharid, das sich hauptsächlich aus den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose, den Hexosen D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose, sowie Glucuronsäure zusammensetzt (Ebringerová et al., 2005; Jäger and Büchs, 2012). Dabei sind Nadelhölzer im Vergleich zu Laubhölzern reicher an Mannose. Laubhölzer bestehen stattdessen zu einem höheren Anteil aus Xylose. Zwischen der Hemicellulose und den Cellulosefibrillen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus. Zudem ist die Hemicellulose über kovalente Bindungen mit Lignin verknüpft, welches ein stark verzweigtes phenolisches Makromolekül ist. Lignin besteht aus den drei phenolischen Hauptkomponenten p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Rubin, 2008).

Der komplexe Aufbau der Cellulose und der Verbund mit Hemicellulose und Lignin machen Lignocellulose zu einer mechanisch sehr stabilen Struktur, welche den Abbau durch Enzyme oder Chemikalien erschwert (Lee and Shah, 2012; Jäger and Büchs, 2012).

2.1.2 Weizenkaff

Bei der Weizenernte fällt beim Dreschen des Getreides Weizenkaff an, das auch als Weizenspreu bekannt ist (Perlack et al., 2011). Dieses Weizenkaff verbleibt meist ungenutzt auf dem Feld und fällt in einer Menge von 1–2 Tonnen pro Hektar an (Beneke and Rumpler, 2013). Neben der Spreu können im Weizenkaff auch Spelzen, Hülsen, Stängelteile oder Grannen enthalten sein (Duguid et al., 2007). Die drei Hauptbestandteile des Weizenkaffs sind 32 % Cellulose, 24 % Hemicellulose und 15 % Lignin (Duguid et al., 2007; Anders, 2014). Somit zählt Weizenkaff zu den ungenutzten, kostengünstigen, agrarischen Reststoffen aus Lignocellulose, die nicht in Konkurrenz mit Lebens- oder Futtermitteln stehen und sich zur Verwendung als Substrat für eine Biokonversion anbieten.

2.2 Biokonversion

Das globale Interesse, nachwachsende lignocellulosehaltige Biomasse zu Biokraftstoff oder hochwertigen Grund- und Plattformchemikalen umzuwandeln, steigt stetig an und bietet eine Alternative zu klassischen chemischen Verfahren (Lynd et al., 2002; FitzPatrick et al., 2010; Menon and Rao, 2012). Werpy et al. (2004) identifizierte 2004 erstmals zwölf Plattformchemikalien, die auf Basis von Biomasse erzeugt und in eine Reihe von hochwertigen biobasierten Chemikalien oder Materialien umgewandelt werden können. Bereits etablierte biotechnologische Verfahren sind die Ethanol- und Milchsäureproduktion (Wyman, 1995; John et al., 2007).

Die Biokonversion teilt sich grob in vier Hauptschritte auf (Mosier et al., 2005; Huber et al., 2006; Menon and Rao, 2012):

- eine effektive Vorbehandlung der Biomasse
- die Produktion von saccharolytischen Enzymen (Cellulase, Hemicellulasen) und die damit verbundene enzymatische Hydrolyse

- die Fermentation der Hexosen und Pentosen
- Aufreinigung und Veredelung des Produktes

Die Vorbehandlung der Biomasse und die enzymatische Hydrolyse sind in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt und werden im Folgenden weiter betrachtet. Auch werden mögliche Prozessstrategien zur Biokonversion in Kapitel 2.2.3 (S. 9) detaillierter beschrieben.

2.2.1 Vorbehandlung

Um Cellulose und Hemicellulose in biotechnologisch verwertbare Zuckermonomere, vorzugsweise mit einer enzymatischen Hydrolyse, umzuwandeln, ist eine Vorbehandlung notwendig (Mosier et al., 2005). Dabei wird die komplexe Struktur der Lignocellulose aufgebrochen und für Enzyme zugänglich gemacht, um so die Zuckerausbeute der enzymatischen Hydrolyse zu erhöhen (Kim et al., 2016). Zusätzlich sollte die Bildung von Zuckerabbauprodukten oder anderen hemmenden Bestandteilen für die nachfolgende Hydrolyse und Fermentation vermieden werden (Kumar et al., 2009). Unter den harschen Bedingungen von hoher Temperatur und meist niedrigem pH-Wert wird in der Vorbehandlung hauptsächlich die Hemicellulose abgebaut, was zur Entstehung von Pentosen und Hexosen führt. Diese Zucker können zu Zuckersäuren, aliphatischen Säuren (Ameisen-, Essig- oder Lävulinsäure), sowie Furanaldehyden (5-Hydroxymethylfurfural (HMF) oder Furfural) weiter abgebaut werden und hemmen die anschließende enzymatische Hydrolyse und Fermentation (Jönsson et al., 2013; Palmqvist and Hahn-Hägerdal,

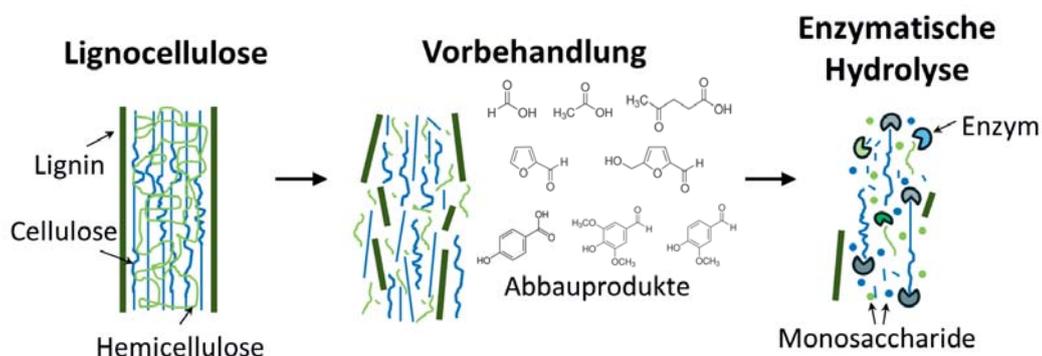


Abbildung 2.2 – Schematische Darstellung einer Lignocellulosevorbehandlung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse (modifiziert nach Mosier et al. (2005) und Lynd et al. (2002)).

2000). In geringeren Konzentrationen können zudem phenolische und aromatische Komponenten aus herausgelöstem Lignin entstehen, die ebenfalls als Inhibitoren bekannt sind (Jönsson et al., 2013; van der Pol et al., 2014).

Es sind unterschiedlichste Vorbehandlungsmethoden für Biomasse bekannt. Sie reichen von einer physikalischen Vorbehandlung, wie Mahlen oder Zerkleinern der Biomasse, über chemische Vorbehandlungen mit Säuren oder Basen, bis hin zu physikalisch-chemischen Methoden, wie dem Dampfaufschluss. Auch biologische Vorbehandlungsmethoden mit Braun- oder Weißfäulepilzen können eingesetzt werden oder die Kombination der unterschiedlichen Methoden. Einen Überblick über Vorbehandlungsmethoden und die Wirkung auf die Lignocellulose geben Kumar et al. (2009), Hendriks and Zeeman (2009), Agbor et al. (2011) oder Stichnothe et al. (2016).

Bei einer alkalischen Vorbehandlung wird größtenteils Natriumhydroxid, Ammoniak oder Calciumhydroxid verwendet. Dabei liegt der Vorteil der alkalischen Vorbehandlung in der niedrigeren Temperatur im Vergleich zu der säurekatalytischen Vorbehandlung (Kim et al., 2016). Durch die Entesterung der intermolekularen Esterbindungen in der Lignocellulose werden Lignin und Hemicellulose herausgelöst, der Polymerisationsgrad der Lignocellulose herabgesetzt, die Kristallinität der Cellulose nimmt ab und die Oberfläche der Biomassepartikel wird durch Aufquellen vergrößert (Kim et al., 2016). Es kommt zur Bildung von Essigsäure als Nebenprodukt durch die Abspaltung der Acetylgruppen der Hemicellulose (Galbe and Zacchi, 2002). Verglichen mit anderen Vorbehandlungsmethoden ist die Bildung von weiteren Zuckerabbauprodukten eher gering, jedoch können Nachteile der basekatalytischen Vorbehandlung lange Verweilzeiten oder die Aufnahme von Salzen in die Biomasse sein (Menon and Rao, 2012).

2.2.2 Enzymatische Hydrolyse

Auf die Vorbehandlung der Lignocellulose folgt meist eine enzymatische Hydrolyse. Dabei werden die einzelnen Bestandteile der Lignocellulose durch spezifische Enzyme aus der Struktur herausgelöst. Für die Spaltung der Cellulose in Glucose werden Cellulase, für die Spaltung in die unterschiedlichen Monosaccharide der Hemicellulose Hemicellulasen, wie beispielsweise Xylanasen, verwendet. Auch der Abbau von Lignin mittels Laccasen ist möglich.

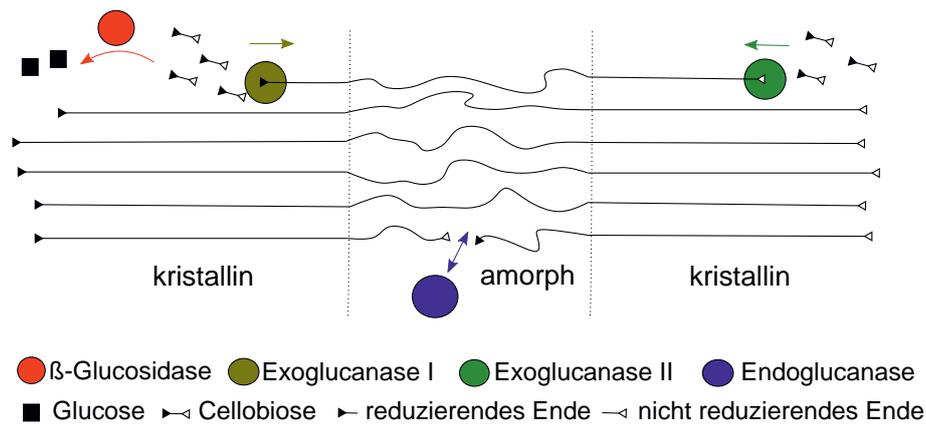


Abbildung 2.3 – Schematische Darstellung einer Cellulosehydrolyse mittels End- und Exoglucanase sowie β -Glucosidase (modifiziert nach Lynd et al. (2002)).

Im Folgenden wird der enzymatische Abbau von Cellulose, dem Polymer mit dem größten Anteil in der Biomasse, beispielhaft betrachtet. Die unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen Cellulasen sind in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt. Exo- und Endoglucanasen können die Cellulose in immer kürzere Ketten schneiden, bis hin zu Cellobiose. Diese kann anschließend zu Glucose mittels β -Glucosidasen hydrolysiert werden. Somit sind insgesamt drei Cellulase-Gruppen notwendig um Cellulose in Glucose-Monomere zu katalysieren (Lynd et al., 2002):

- Endoglucanasen (1,4- β -D-glucan-4-Glucanohydrolasen) hydrolysieren Cellulose in den amorphen Bereichen der Polysaccharidkette und produzieren Oligosaccharide unterschiedlicher Länge.
- Exoglucanasen (1,4- β -D-glucan-Cellobiohydrolasen) hydrolysieren reduzierende (EX I) oder nicht-reduzierende (EX II) Enden der Polysaccharidkette in amorphen und kristallinen Bereichen und spalten als Hauptprodukt Cellobiose ab.
- β -Glucosidasen (β -D-glucoside-Glucohydrolasen) katalysieren größtenteils die Hydrolyse der abgespaltenen Cellobiose zu Glucose.

Diese Cellulasemischungen werden von Bakterien und Pilzen produziert. Zur industriellen Produktion wird häufig die Gattung *Trichoderma* verwendet, deren Enzyme im pH-Bereich von pH 4–pH 6 und unter 70 °C effektiv zur Cellulosehydrolyse genutzt werden können (Wyman et al., 2005).

Die Spaltung von Hemicellulose ist im Vergleich zu Cellulose aufgrund der amorphen Polysaccharidstruktur sehr komplex und es werden basierend auf der

jeweiligen Biomasse unterschiedlichste Enzyme benötigt, wie beispielsweise Xylanasen, Arabinosidasen, Acetylxylosterasen oder Glucuronidasen (Wyman et al., 2005). Überblicke über den Hemicelluloseabbau geben unter anderem Coughlan and Hazlewood (1993) und Sunna and Antranikian (1997).

2.2.3 Prozesskonfiguration

Die einzelnen Schritte der Biokonversion von Lignocellulose -

1. Vorbehandlung,
2. Produktion von Enzymen,
3. Hydrolyse der vorbehandelten Lignocellulose und
4. die Fermentation von Pentosen und Hexosen

können in unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden (Lynd et al., 2002). In Abbildung 2.4 sind drei mögliche Prozesskonfigurationen aufgeführt. Alle Prozesse haben gemeinsam, dass die Lignocellulose zuvor vorbehandelt werden sollte, um die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse zu steigern. Wird die Hydrolyse getrennt von der Fermentation durchgeführt, liegt eine sogenannte Separate Hydrolyse und Fermentation (SHF, englisch - separate hydrolysis and fermentation) vor. Hierbei werden als erstes Cellulose und Hemicellulose in kürzere Zuckerketten und Zuckermomere von vorab produzierten oder kommerziell erworbenen Enzymen gespalten. Die Hydrolyse läuft unter höchster Effektivität ab, da Temperatur und pH-Wert optimal für die Enzyme gewählt werden können. Nachteilig an dieser Prozessführung ist, dass es zu einer Produktinhibierung der Cellulasen durch Cellobiose und Glucose kommen kann (Alfani et al., 2000). Nach der Hydrolyse erfolgen die Fermentation der vorliegenden Zucker und die Bildung des Produktes unter optimalen Bedingungen für den Mikroorganismus.

Bei einer Simultanen Verzuckerung und Fermentation (SSF, englisch - simultaneous saccharification and fermentation) laufen Hydrolyse und Fermentation parallel in einem Bioreaktor ab (Lynd et al., 1999). Hierbei können die entstandene Glucose und weitere Monosaccharide direkt zum Produkt umgesetzt werden, so dass eine Inhibierung der zugesetzten Enzyme minimiert wird. Die optimalen Temperatur- und pH-Wert-Bedingungen sind für Mikroorganismen und Enzyme

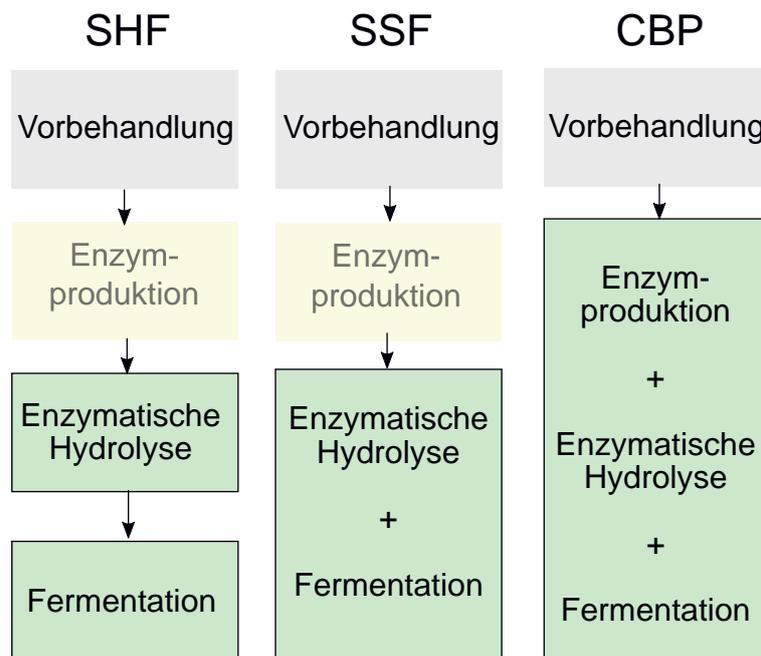


Abbildung 2.4 – Schematische Darstellung unterschiedlicher Prozessstrategien für die Biokonversion (modifiziert nach Lynd et al. (2002) und Jäger and Büchs (2012)). SHF - Separate Hydrolyse und Fermentation, SSF - Simultane Verzuckerung und Fermentation, CBP - Konsolidierter Bioprozess.

nicht identisch und stellen in einem SSF einen Kompromiss dar. Jedoch ist es trotzdem möglich, dass ein SSF im Vergleich zum SHF höhere Ausbeuten und kürze Verweilzeiten erzielt, wie bei der Ethanolproduktion mit *Pichia stipitis* (Marques et al., 2008). Insgesamt betrachtet liegt der Vorteil eines SSFs gegenüber einem SHFs in der Kostenreduktion, da zwei Prozessstufen zu einer zusammengelegt werden (Alfani et al., 2000).

Optimal wäre es die Produktion von Enzymen, Hydrolyse der vorbehandelten Lignocellulose und die Fermentation in einem einzigen Prozessschritt durchzuführen, den sogenannten Konsolidierten Bioprozess (CBP, englisch - consolidated bioprocessing). So könnten die Kosten weiter gesenkt werden, da für die Enzymproduktion die vorhandene Lignocellulose eingesetzt werden kann (Lynd et al., 2005). Natürliche Mikroorganismen mit diesen kombinierten Eigenschaften sind nicht bekannt, könnten aber durch genetische Veränderungen, wie für die Ethanolproduktion, erzeugt werden (Olson et al., 2012).

2.3 Itaconsäure

Itaconsäure (IA, englisch - itaconic acid) zählt aufgrund ihrer chemischen Struktur zu den hochwertigen biobasierten Chemikalien, die aus Biomasse erzeugt werden können (Werpy et al., 2004). Die dreifach funktionale Struktur mit einer ungesättigten Doppelbindung und zwei Carboxylgruppen ermöglicht eine Vielfalt an Reaktionen und Anwendungen (Abbildung 2.5). So kann Itaconsäure petrochemisch basierte Methacrylsäure oder Acrylsäure ersetzen (Robert and Friebel, 2016; Magalhães et al., 2017). Aufgrund der zwei Carboxylgruppen hat die Itaconsäure zwei pK_S -Werte, die für 20 °C bei $pK_{S1}=3,84$ und $pK_{S2}=5,55$ liegen, somit ist der Dissoziationsgrad der Säure stark vom herrschenden pH-Wert abhängig (Rychtera and Wase, 1981). Bei pH-Werten $< \text{pH } 2$ liegt hauptsächlich die nicht-dissoziierte Säure vor, wobei bei einem pH-Wert $> \text{pH } 7$ zum größten Teil das zweifach-dissoziierte Itaconat vorliegt. Im Bereich von pH 2–pH 7 kommt es zu einem Gemisch aller Dissoziationsformen. Alle Eigenschaften der Itaconsäure sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

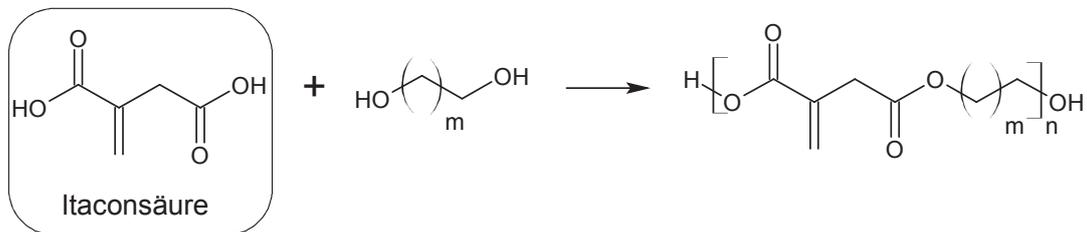


Abbildung 2.5 – Strukturformel der Itaconsäure und die Möglichkeit der Polykondensation.

Tabelle 2.1 – Wichtige Eigenschaften der Itaconsäure (Willke and Vorlop, 2001).

Summenformel	$C_5H_6O_4$
Molare Masse	130,1 g/mol
Aggregatzustand	fest
Erscheinungsbild	weißes kristallines Pulver
Dichte	1,63 g/cm ³
Schmelzpunkt	162-167 °C
Siedepunkt	268 °C
pK_S -Werte	3,84 und 5,55
Löslichkeit in H ₂ O	83 g/L (20 °C)



2.3.1 Itaconsäureproduktion und Anwendungen

Itaconsäure ist chemisch und biotechnologisch herstellbar und wurde erstmals von Baup (1837) als Produkt der Thermolyse von Citronensäure und einer anschließenden Hydrolyse der entstandenen Anhydride beschrieben. Auch die Gewinnung von Itaconsäure über die Decarboxylierung von Aconitsäure (Luskin, 1974) und die Oxidation von Isoprenen zu Citraconsäure gefolgt von einer Isomerisierung (Berg and Hetzel, 1978) sind bekannt.

Die erste biotechnologische Produktion von Itaconsäure beschrieb Kinoshita (1932) mit *Aspergillus itaconicus*. Höhere Itaconsäurekonzentrationen konnte Calam et al. (1939) mit *Aspergillus terreus* als Oberflächenkultur erzielen. Charles Pfizer Co. meldete 1945 das erste Patent zu einem industriellen Produktionsprozess von Itaconsäure durch submerse Kultivierung von *A. terreus* an (Kane et al., 1945) und errichtete 1955 die erste Produktionsanlage in Brooklyn (USA). Weitere Produktionsanlagen befanden sich in Japan, England und Frankreich, diese wurden aber aufgrund der Forderungen nach möglichst geringen Produktionskosten verstärkt in den Asien-Pazifik-Raum verlegt (Weastra, s.r.o., 2013; Okabe et al., 2009). Die aktuellen Hauptproduzenten von Itaconsäure sind Qingdao Kehai Biochemical Co.,Ltd und Zhejiang Guoguang Biochemistry Co., Ltd. in China mit jeweils 10.000–15.000 t jährlich (Tsao et al., 2010; Weastra, s.r.o., 2013). Die geschätzte Itaconsäureproduktion weltweit lag 2011 bei 41.400 t mit einem Marktwert von 74,5 Millionen US\$ (Weastra, s.r.o., 2013). Dabei schwankt der Preis pro Kilogramm Itaconsäure zwischen 1,80–2,00 US\$ je nach Hersteller und Qualität des Produktes.

Aufgrund der stetigen Optimierung der Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* seit den 60er Jahren, ist das biotechnologische Produktionsverfahren im Vergleich zu den chemischen Prozessen wirtschaftlicher und die chemischen Verfahren können nicht mit dem biotechnologischen Verfahren konkurrieren (Tate, 1981).

Itaconsäure kann aufgrund der zwei Carboxylgruppen und der Doppelbindung als Monomer oder Comonomer eingesetzt werden, somit ist die Bildung unterschiedlichster Polyester möglich (Delidovich et al., 2015; Robert and Friebel, 2016; Kumar et al., 2017). Aber auch Itaconsäurederivate, wie beispielsweise 3-Methylpyrolidin, 2-Methyl-1,4-Butanandiamin, Itaconsäurediamid, 3-Methyltetrahydrofuran oder ungesättigte Ester sind vielfältig einsetzbar. Angewendet werden Itaconsäure und deren Derivate in

- Styrol-Butadien Kautschuk,
- synthetischem Latex,
- superabsorbierenden Polymeren,
- ungesättigten Polyesterharzen oder
- Detergenzien.

Auch das Einsatzgebiet dieser Produkte ist weit gestreut und reicht von der Farb-, Lack- und Papierindustrie über Hygiene- und Medizinprodukten bis hin zum Bausektor, auch der Einsatz in Beschichtungen, Weichmachern, Chemiefasern oder anderen Kunststoffen ist bekannt (Willke and Vorlop, 2001; Okabe et al., 2009; Klement and Büchs, 2013; Magalhães et al., 2017). Sollte es gelingen die Kosten der Itaconsäureherstellung weiter zu senken, könnte die Itaconsäure breiter eingesetzt und bestehende Anwendungen ausgebaut werden. So wäre in Zukunft beispielsweise ein Einsatz der Itaconsäure für die Methylmethacrylat-Herstellung (thermoplastische Kunststoffe) denkbar und die Itaconsäureproduktion in 2020 könnte so auf knapp 407.000 t jährlich ansteigen mit einem Marktwert von etwa 500 Millionen US\$ (Weastra, s.r.o., 2013). Dabei sollten die Produktionskosten für Polyitaconsäure basierend auf Biomasse von 3 US\$/kg auf $\leq 1,50$ US\$/kg sinken, um die petrochemisch-basierte Polyacrylsäure zu ersetzen (Durant, 2009).

2.3.2 Itaconsäureproduzenten

Neben dem industriell verwendeten Stamm *A. terreus* sind auch andere Organismen, wie *Ustilaginaceae*, in der Lage Itaconsäure zu bilden (Haskins et al., 1955; Guevarra and Tabuchi, 1990; Geiser et al., 2014). Weitere Hefen der Spezies *Pseudozyma* (Levinson et al., 2006; Specht et al., 2014), *Candida* (Tabuchi et al., 1981) oder die Pilze *Rhodotorula* (Kawamura et al., 1981) und *Helicobasidium* (Sayama et al., 1994) bilden ebenfalls die Dicarbonsäure. Specht et al. (2014) erzielte mit *Pseudozyma tsukubaensis* mit einer oszillierenden Gelöstsauerstoffkonzentration, die einer Sinusfunktion folgte, die höchste erzielte Itaconsäurekonzentration von 75 g/L der alternativen Organismen. Die Gattung *Ustilago* erzielt maximal eine Konzentration von 44,5 g/L Itaconsäure (Maassen et al., 2014). Beide Titer liegen deutlich unter der erzielten Konzentration von 129 g/L Itaconsäure mit *A. terreus* (Hevekerl et al., 2014b). Des Weiteren sind auch Cyanobakterien (Chin et al.,

2015) und Säugetiermakrophagen (Strelko et al., 2011) in der Lage, Itaconsäure in Spuren zu bilden.

Neben den natürlichen Itaconsäureproduzenten werden zunehmend genetisch modifizierte Organismen erzeugt. Dabei werden häufig Plasmide mit Itaconsäuresynthesenzymen, wie dem Schlüsselenzym cis-Aconitatdecarboxylase, das cis-Aconitat zu Itaconsäure katalysiert, in Mikroorganismen eingebracht. Auch wichtige Transportersysteme für die Itaconsäureproduktion, die cis-Aconitat vom Mitochondrium in das Cytosol transportieren (*mttA*) oder Itaconsäure aus der Zelle heraustransportieren (*mfsA*), werden so in Organismen übertragen, die auf natürlichem Wege keine Itaconsäure produzieren könnten. Einen Überblick über unterschiedlichste itaconsäurebildende Organismen ist in Tabelle 2.2 gegeben.

Tabelle 2.2 – Übersicht über natürliche Itaconsäureproduzenten (oben) und genetisch veränderte Organismen zur Itaconsäureproduktion (unten).

Organismus	Itaconsäure [g/L]	Referenz
<i>Aspergillus itaconicus</i>	k. A.	Kinoshita (1932)
<i>Aspergillus terreus</i>	~25	Kane et al. (1945)
<i>Aspergillus terreus</i>	129	Hevekerl et al. (2014b)
<i>Candidia</i> sp.	35	Tabuchi et al. (1981)
<i>Helicobasidium</i> sp.	k. A.	Sayama et al. (1994)
<i>Pseudozyma antarctica</i>	30	Levinson et al. (2006)
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	75	Specht et al. (2014)
<i>Rhodotorula</i> sp.	15	Kawamura et al. (1981)
<i>Synechocystis</i> sp.	0,145	Chin et al. (2015)
<i>Ustilago cynodontis</i>	31	Guevarra and Tabuchi (1990)
<i>Ustilago maydis</i>	44,5	Maassen et al. (2014)
<i>Ustilago rabenhorstina</i>	16	Guevarra and Tabuchi (1990)
<i>Ustilago spermophora</i>	13	Guevarra and Tabuchi (1990)
<i>Aspergillus niger</i>	26,2	Hossain et al. (2016)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7,8	Otten et al. (2015)
<i>Escherichia coli</i>	32	Harder et al. (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,168	Blazeck et al. (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4,6	Blazeck et al. (2015)

2.4 *Trichocomaceae*

Die Familie der *Trichocomaceae* wird der Gruppe der *Ascomyceten* zugeordnet, die wiederum der Gruppe der *Eumycota* untergeordnet ist. *Aspergillus* und *Penicillium* zählen zu den bekanntesten filamentösen Pilzen der *Trichocomaceae*. Der Itaconsäureproduzent *A. terreus* zählt zu der Gattung des Gießkannenschimmels. Die Fortpflanzung erfolgt asexuell entweder über die Ausbildung von Konidien (Abbildung 2.6) oder über Chlamydosporen (Deak et al., 2009). Die Ausbildung von Konidien ist bei Oberflächen- und Submerskulturen beschrieben (Hevekerl, 2016). Dabei bildet sich aus einer Fußzelle ein Konidophor aus, dessen Spitze sich zu einem Vesikel verdickt. Am Vesikel entstehen Metulea, auf denen jeweils ein Bündel Phialiden sitzen, an denen sich wiederum perlenschnurartig die Konidien aufreihen (Fuchs and Schlegel, 2006). Die Chlamydosporen bilden sich in submersen Kulturen. Dabei formt sich entweder an einer Hyphe oder an einer Hyphenspitze eine Chlamydospore. Die Chlamydosporen sind mit 4–7 µm doppelt so groß, wie die Konidien mit 2–4 µm (Deak et al., 2009).

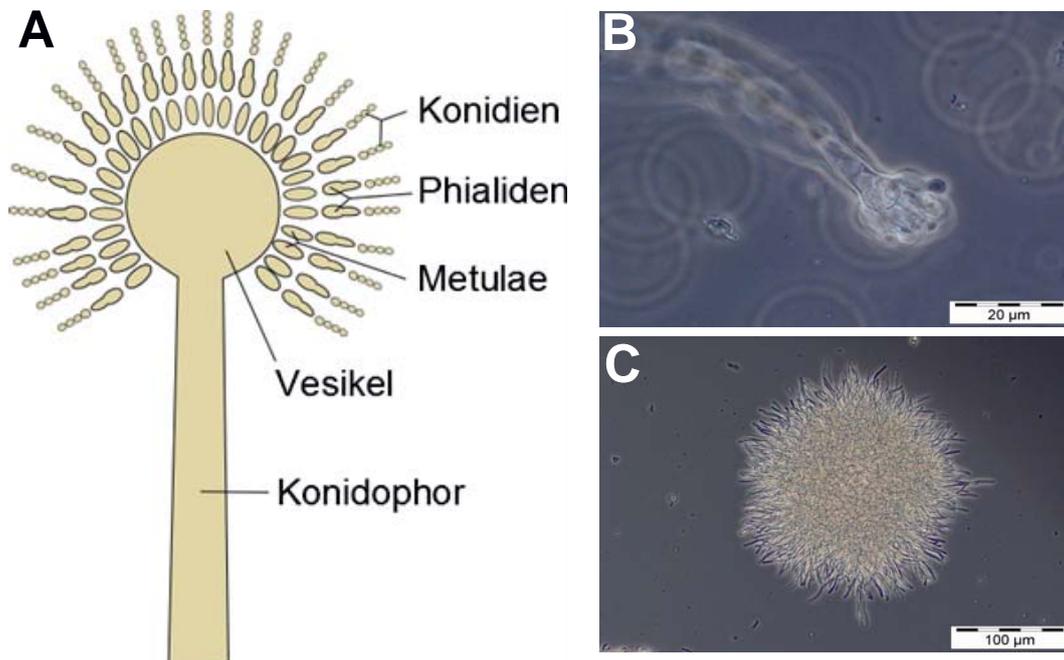


Abbildung 2.6 – Konidienträger von *A. terreus* und Pelletwachstum in Submerskultivierung. A - schematische Darstellung eines Konidienträgers (modifiziert nach Heiss and Eichner (2002)), B - mikroskopische Aufnahme eines submersen Konidienträgers, 1000-fach vergrößert, C - mikroskopische Aufnahme von *A. terreus* als Pellet in Submerskultur, 200-fach vergrößert.

2.4.1 Stoffwechselweg

Rychtera and Wase (1981), Welter (2000) und Willke and Vorlop (2001) nahmen an, dass eine Phosphatlimitierung der Auslöser der Itaconsäureüberproduktion von *A. terreus* ist. Diese These wurde jedoch von Hevekerl et al. (2014b) widerlegt, weder eine Phosphat- noch eine Stickstofflimitierung sind für eine Itaconsäureüberproduktion notwendig. Der genaue Auslöser für die Überproduktion ist somit weiterhin unbekannt.

Für die Bildung von Itaconsäure (Abbildung 2.7) werden Zucker, wie Glucose, Xylose oder Arabinose, von *A. terreus* aufgenommen (Eimhjellen and Larsen, 1955; Saha et al., 2017) und über die Glycolyse und den Pentosephosphatweg im Cytoplasma in Pyruvat umgewandelt. Das Pyruvat wird in das Mitochondrium transportiert und über den Citratzyklus zu Citrat und weiter zu cis-Aconitat katalysiert. Cis-Aconitat gelangt über einen Citrat-Malat-Antiporter bzw. mit-

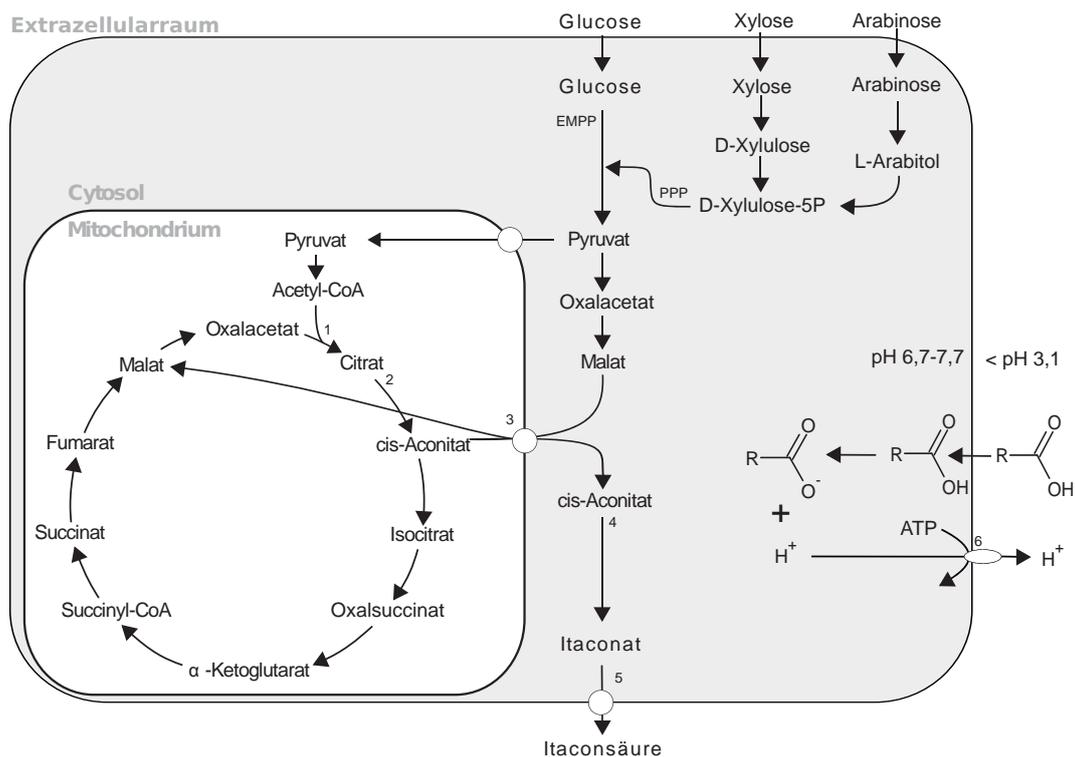


Abbildung 2.7 – Schematischer Biosyntheseweg von Itaconsäure in *A. terreus* (Bonnamme et al., 1995; Jaklitsch et al., 1991; Li et al., 2011) und Gleichgewicht der schwachen Säuren im Medium und Cytoplasma (Lambert and Stratford, 1999). EMPP Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, PPP Pentosephosphatweg, 1 Citrat-Synthase, 2 Isocitrat-Dehydrogenase, 3 Citrat-Malat-Antiporter, Mitochondrialer-Tricarboxylat-Transporter, 4 cis-Aconitat-Decarboxylase, 5 Major-Facilitator-Superfamilie Protein, 6 H^+ -ATPase.

ochondrialen Tricarboxylat-Transporter in das Cytoplasma und wird mittels der cis-Aconitat-Decarboxylase (CAD) zu Itaconat umgewandelt (Bonnarme et al., 1995; Jaklitsch et al., 1991; Steiger et al., 2013). Das Itaconat gelangt mittels eines Transporters, der vermutlich zu der Gruppe der Major-Facilitator-Superfamilie-Proteine gehört, in das Medium (Li et al., 2011). Somit kann bei der Umsetzung von 1 Mol Glucose, Xylose oder Arabinose 1 Mol Itaconsäure gebildet werden. Dies entspricht einer maximalen theoretischen Ausbeute von 72 % (Saha et al., 2017).

2.4.2 Morphologie

Aus den Sporen von *A. terreus* bilden sich Keimschläuche, die zu Hyphen werden. Das anschließende Wachstum der Hyphen erfolgt an der Spitze oder über die Teilung der Spitze. Durch die Vermehrung und Fusion von Hyphen wird eine netzartige Struktur ausgebildet, das Mycel (Kück et al., 2009). In Submerskulturen zeigt *A. terreus* aufgrund chemischer und physikalischer Einflussfaktoren verschiedene morphologische Formen, von verzweigten Mycelfilamenten (filamentöses Wachstum) bis hin zu dicht verwobenen Mycelmassen (Pelletwachstum) (Papagianni, 2004). Abbildung 2.6–C (S. 15) zeigt ein lockeres ausgefranstes Pellet von *A. terreus* mit einem Durchmesser von etwa 150 µm in einer Submerskultivierung. Ein solches lockeres Pellet mit einem Durchmesser von 0,1–0,5 mm zeigt die höchste Produktivität und Ausbeute von Itaconsäure (Gyamerah, 1995a). Aus diesem Grund werden diese Pellets bei der Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion bevorzugt. Kompaktere oder größere Pellets führen im Inneren der Pellets zu einer Unterversorgung an Sauerstoff und Nährstoffen, zudem können Stoffwechselprodukte nicht vollständig abtransportiert werden. Speziell eine Sauerstofflimitierung sollte bei der Itaconsäureproduktion vermieden werden, da eine kurzzeitige Unterversorgung von 5 Minuten zu einem Stillstand der Produktion führt (Gyamerah, 1995b). Auch bei der Bildung von Mycelfilamenten kommt es zu Stofflimitationen durch eine erhöhte Viskosität und eine daraus resultierende schlechtere Durchmischung der Fermentationsbrühe.

Besonders Eisen-, Zink-, Calcium-, Cobalt-, Nickel- und Manganionen im Medium können die Morphologie von *A. terreus* stark beeinflussen (Lockwood and Reeves, 1946; Kobayashi, 1978; Gyamerah, 1995a; Welter, 2000; Kuenz et al., 2012; Karaffa et al., 2015). So führen zum Beispiel zu geringe Calciumkonzentrationen zu sehr kompakten Pellets, wohingegen zu hohe Konzentrationen zu einer knollenarti-

gen Mycelstruktur führen (Kuenz et al., 2012). Im Hinblick auf Manganionen wird von Karaffa et al. (2015) ein Medium mit einer Konzentration $< 3 \mu\text{g/L}$ empfohlen. Bei höheren Mangankonzentrationen geht das Pelletwachstum in ein lockeres stark verzweigtes Mycelwachstum über, das zu einer reduzierten Itaconsäureausbeute und -produktivität führt. Somit ähnelt die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* in der Empfindlichkeit des Organismus sehr stark der Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger*. Auch hier wird der Einfluss unterschiedlicher Schwermetallionen auf die Morphologie und somit auf die Säureproduktion beschrieben (Tomlinson et al., 1950; Clark et al., 1966). Neben der Morphologie werden durch die Schwermetalle auch relevante Enzyme bei der Itaconsäureproduktion, wie das Schlüsselenzym CAD, gehemmt (Dwiarti et al., 2002).

2.4.3 Substrate

A. terreus kann unterschiedliche Substrate wie Glucose, Xylose, Saccharose, aber auch Glycerin oder Ethanol, für das Wachstum und die Itaconsäurebildung nutzen (Eimhjellen and Larsen, 1955). Dabei werden die höchsten Ausbeuten mit Saccharose und Glucose erzielt. Alternativ zu den reinen Zuckern wurden Zuckerrüben- und Zuckerrohrmelassen (Kane et al., 1945; Batti and Schweiger, 1963) oder Stärkehydrolysate (Cros and Schneider, 1993; Yahiro et al., 1997; Petruccioli et al., 1999; Dwiarti et al., 2007) erfolgreich für die Itaconsäureproduktion verwendet. Auch die Nutzung von alternativen und nachwachsenden Polysacchariden in Form von Hydrolysaten für die Itaconsäureproduktion rückt verstärkt in den Fokus der Forschung (Tippkötter et al., 2014; Li et al., 2016; Pedroso et al., 2017; Wu et al., 2017). Solche alternativen Zucker müssen im Gegensatz zu den reinen Zuckern vor der Verwendung über Aktivkohle, Ionentauscher oder Ferrocyanide aufgereinigt werden, da der Pilz sehr sensitiv auf Verunreinigungen reagiert (s. Kapitel 2.4.2) (Batti and Schweiger, 1963; Von Fries, 1966; Kobayashi, 1978). Diese Verunreinigungen können über eine Verringerung der Ausbeute und Produktivität bis hin zur Hemmung der Itaconsäurebildung führen. Aus diesen Gründen wird neben einer komplexen Aufreinigung auch die Erzeugung von *A. terreus* Mutanten, die robuster gegenüber diesen Störstoffen sein sollen, in Betracht gezogen (Li et al., 2016; Wu et al., 2017).

2.4.4 pH-Wert

Der Start-pH-Wert (pH 2–pH 4) der Kultivierung hat auf die Itaconsäureproduktion keinen Einfluss (Batti and Schweiger, 1963; Hevekerl et al., 2014b). Typischerweise fällt der anfängliche pH-Wert unabhängig vom Start-pH während der Auskeimung der Sporen auf einen pH-Wert unter pH 2 und verbleibt bis zum Ende der Kultivierung auf diesem Niveau. Diese pH-Absenkung in der Auskeim- und frühen Wachstumsphase des Pilzes ist äußerst relevant, da nur Mycel in der Lage ist, hohe Itaconsäurekonzentrationen zu erzielen, das bei einem niedrigen pH-Wert von $< \text{pH } 2,1$ angewachsen ist (Eimhjellen and Larsen, 1955; Hevekerl et al., 2014b). Eimhjellen and Larsen (1955) vermuten, dass unter diesem geringen pH-Wert relevante Enzymsysteme für die Itaconsäureproduktion aktiviert werden. Nach Beginn der Itaconsäureproduktion führen unterschiedliche Strategien bezüglich des pH-Wertes zu einer ähnlichen Endkonzentration von ca. 90 g/L Itaconsäure. Kuenz (2008) stellte den pH-Wert zu Beginn der Kultivierung auf pH 3,1 ein und regelte im weiteren Verlauf den pH-Wert nicht, sodass dieser auf unter pH 2 absank. Dagegen hoben Batti and Schweiger (1963) den pH-Wert nach 5,8 Tagen auf pH 3,2 mit Ammoniakwasser einmalig an. Eine deutliche Steigerung der Endkonzentration auf 129 g/L konnte durch Hevekerl et al. (2014b) erzielt werden, indem der pH-Wert nach 2 Tagen auf pH 3 mit einer Ammoniaklösung angehoben und geregelt wurde. Die Erhöhung der Konzentration wurde von Hevekerl et al. (2014b) mit einer erhöhten Löslichkeit der Itaconsäure bei höheren pH-Werten in der Fermentationsbrühe begründet.

Der intrazelluläre pH-Wert von *A. terreus* ist vergleichbar mit dem intrazellulären pH-Wert von *A. niger* mit pH 6,6–pH 7,6 (Hesse et al., 2002), wobei außerhalb der Zelle der pH-Wert, wie beschrieben, unter pH 3,1 sinkt. Somit ist es möglich, dass Verunreinigungen in Hydrolysaten, wie schwache Säuren, in die Zelle diffundieren und im Cytoplasma, aufgrund des höheren intrazellulären pH-Wertes, in Säureanion und Proton dissoziieren. Das Proton kann unter ATP-Verbrauch mittels H^+ -ATPase aus der Zelle transportiert werden, um dem Absinken des intrazellulären pH-Wertes entgegen zu wirken (Lambert and Stratford, 1999). Dieser Vorgang ist beispielhaft in Abbildung 2.7 (S. 16) dargestellt.

2.5 *Ustilaginaceae*

Die Gruppe der *Ustilaginaceae* zählt zu der Familie der Brandpilze und gehört zum Phylum der *Basidiomycota* (Hibbett et al., 2007). Zu den bekanntesten Pflanzenparasiten dieser Gruppe zählen *Ustilago nudas* als Gerstenflugbrand und *Ustilago maydis* als Maisbeulenbrand. Sie bilden Tumoren an den Blüten der Pflanze, befallen einzelne Körner und führen zu hohen Ernteverlusten in der Landwirtschaft (Martinez-Espinoza et al., 2002). Die am besten beschriebene Spezies ist *U. maydis* (Abbildung 2.8), welcher als Modellorganismus für die Untersuchung von Krankheitsentstehung bei Pflanzen (Bölker, 2001) dient und im Jahr 2006 vollständig sequenziert wurde (Kamper et al., 2006). Aus diesem Grund werden der Stoffwechselweg und die Morphologie dieses Mikroorganismus im Folgenden beispielhaft für die Gruppe der *Ustilaginaceae* beschrieben.

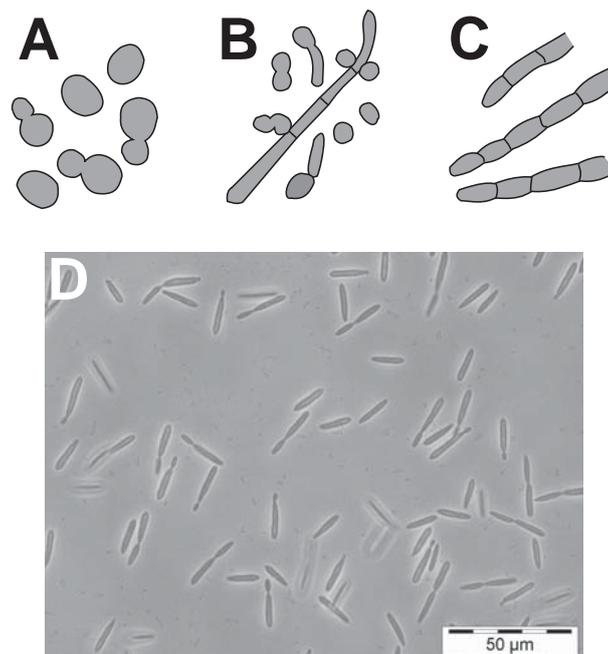


Abbildung 2.8 – Schematische Darstellung der Wachstumsformen von *U. maydis*
A - Hefeform, B - Pseudomycel, C - Mycel und D - mikroskopische Aufnahme einer Vorkultur von *U. maydis*, 400-fach vergrößert.

2.5.1 Stoffwechselweg

Der Stoffwechselweg von *U. maydis* zur Bildung von Itaconsäure ist vergleichbar mit dem Stoffwechselweg von *A. terreus* (s. Kapitel 2.4.1, S. 16). Jedoch zeigte Geiser et al. (2015), dass *U. maydis* cis-Aconitat im Cytosol erst in trans-Aconitat

und dann zu Itaconsäure umwandelt. Neben den Genen für die Enzyme Aconitat- Δ -Isomerase (Adi1) und trans-Aconitase (Tad1) der beschriebenen Schritte, wurden im selben Gencluster der Itaconsäure-Synthese auch ein mitochondrialer cis-Aconitatexporter (Mtt1) und ein Itaconsäureexporter (Itp1), der zu der Major-Facilitator-Superfamilie gehört, nachgewiesen.

Nach aktuellem Stand der Literatur ist der Auslöser der Überproduktion von Itaconsäure bei *U. maydis* auf eine Ammoniumlimitierung zurückzuführen (Maassen et al., 2014). Eine Stickstofflimitation führt bei *U. maydis* jedoch auch zur Bildung von intra- und extrazellulären Lipiden (Haskins et al., 1955; Hewald et al., 2005). Speziell die Bildung von extrazellulären Glycolipiden, wie Ustilagic acid oder Mannosylerythritollipid (MEL) wurde nachgewiesen (Bölker et al., 2008). Dabei bildet Ustilagic acid Öltropfen und MEL zeigt nadelartige Kristalle im Medium.

2.5.2 Morphologie

Das Wachstum von *U. maydis* ist dimorph. Dabei können sich die nicht-pathogenen haploiden Zellen durch Knospung vermehren und zeigen ein hefeartiges Aussehen oder es bilden sich Pseudohyphen bzw. echte Hyphen aus (Bölker, 2001; Begerow et al., 2006). Die Morphologie ist schematisch in Abbildung 2.8 (S. 20) dargestellt. Bei der Bildung von Itaconsäure mit *U. maydis* wurde durchgängig ein hefeartiges Wachstum in der Literatur beschrieben (Guevarra and Tabuchi, 1990; Klement and Büchs, 2013; Maassen et al., 2014). Diese Wachstumsform als Einzelzellen könnte vorteilhaft gegenüber der filamentösen Mycelform von *A. terreus* sein, die eine erhöhte Viskosität und eine erschwerte Sauerstoffversorgung aufweist (Klement and Büchs, 2013).

KAPITEL 3

Material und Methoden

3.1 Kultivierung von *Trichocomaceae*

In dieser Arbeit wurde *Aspergillus terreus* DSM 23081 verwendet, welcher bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt ist.

3.1.1 Herstellung einer Sporensuspension aus Oberflächenkulturen und Stammhaltung

Zur Herstellung einer Sporensuspension aus Oberflächenkulturen wurde eine Stammkultur bei Raumtemperatur aufgetaut und je 60 μL der Kultur auf modifizierten Czapek-Dox Agarplatten (Tabelle 3.1) ausgestrichen. Die Platten wurden vier Tage bei 30 °C inkubiert, bis sich ein dichter Pilzrasen gebildet hatte. Zum Ernten der Sporen wurden 6 mL einer 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung auf die bewachsene Agarplatte gegeben, die Sporen mit einer Impföse abgeschert und in der Lösung suspendiert. Die erhaltene Suspension aus Oberflächenkulturen wurde in sterilen Laborflaschen bei 4 °C gelagert. Mittels Zählkammer nach Thoma wurde die Konzentration der Sporen in der Suspension ermittelt (Kapitel 3.1.3, S. 24). Die

Tabelle 3.1 – Zusammensetzung des Czapek-Dox-Agars nach Hevekerl (2016).

Substanz	Konzentration [g/L]
Agar-Agar	15
Saccharose	30
K ₂ HPO ₄	1
NaNO ₃	3
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,0005
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0005
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0005

Sporen aus Oberflächenkulturen wurden zur Herstellung von Kryostockkulturen verwendet sowie für die Herstellung von Sporen aus Submerskulturen.

Für die Stammhaltungen wurde die Sporensuspension mit sterilem Pharmaglycerin in 2 mL Kryogefäßen vermischt (50 % (v/v)) und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.2 Herstellung einer Sporensuspension aus Submerskulturen

Für die Produktion von Sporen aus Submerskulturen wurde eine Standardfermentation in einem 1,5 L-Bioreaktor durchgeführt (Kapitel 3.1.7, S. 26), welcher mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL aus Oberflächenkulturen angeimpft wurde. Nach zwei Tagen wurde der pH-Wert einmalig und manuell durch die Zugabe einer NaOH-Lösung (5 M) auf pH 5 angehoben. Während der weiteren Kultivierung wurde der pH-Wert nicht mehr korrigiert. Nach weiteren drei Tagen konnten die gebildeten submersen Sporen mittels Prüfsieb (80 µm) vom Mycel getrennt werden. Die Sporensuspension wurde bei 4.600 g für 30 Minuten zentrifugiert (Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und anschließend zweimal mit einer 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Die Sporen wurden in 100 mL NaCl-Lösung resuspendiert, die Konzentration der Sporen mittels Thoma-Zählkammer bestimmt und die Suspension in einer sterilen

Laborflasche bei 4 °C gelagert. Für alle dargestellten Versuche mit *A. terreus* wurden Sporen aus Submerskulturen verwendet.

3.1.3 Bestimmung der Sporenkonzentration

Die Sporenkonzentration wurde mit einer Thoma-Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Die Kammertiefe betrug 0,02 mm und die Kleinquadratfläche 0,0025 mm². Die Kammer bestand aus zwei 4 x 4 Großquadraten, die wiederum in 4 x 4 Kleinquadrate unterteilt waren. Die Trägerstege der Kammer wurden angefeuchtet und ein Deckglas aufgelegt, sodass Newtonsche Ringe erkennbar waren. Die Sporensuspension wurde aufgegeben und zog sich durch Kapillarkräfte unter das Deckglas. Es wurden 16 Großquadrate ausgezählt und die Sporenkonzentration mittels Gleichung 3.1 berechnet.

$$c_{Sporen} = \frac{\bar{n} \cdot 10^3}{A \cdot h} \quad (3.1)$$

- c_{Sporen} – Sporenkonzentration [Sporen/mL]
- \bar{n} – Mittelwert der Sporen pro Kleinquadrat
- A – Fläche eines Kleinquadrates [mm²]
- h – Kammerhöhe [mm]

3.1.4 Mediumzusammensetzung

Das verwendete Standardproduktionsmedium ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde die aufgeführte Zusammensetzung verwendet. Die Komponenten wurden als einzelne Stammlösungen angesetzt und der pH-Wert mit 0,5 M H₂SO₄ auf pH 3,1 eingestellt. Um eine Ausfällung von CaSO₄ in der CaCl₂-Lösung zu verhindern, wurde der pH-Wert dieser Lösung nicht korrigiert. Die Lösungen wurden bei 121 °C für 20 Minuten und 1 bar Überdruck sterilisiert und die FeCl₃-Lösung sterilfiltriert. Alle Medienbestandteile wurden unter einer Sterilwerkbank zusammengeführt.

Für die Untersuchung weiterer Substrate wurde Glucose gegen die jeweilig genannten Kohlenstoffquellen ausgetauscht. Bei Inhibierungsversuchen wurde die Enzymmischung, Ameisen-, Essig- oder Lävulinsäure, HMF oder Furfural dem Medium hinzugefügt und der pH-Wert auf pH 3,1 korrigiert.

Tabelle 3.2 – Standardproduktionsmedium zur Kultivierung von *A. terreus*.

Substanz	$c_{\text{Standardmedium}}$ [g/L]	$c_{\text{Stammlösung}}$ [g/L]	Volumen [mL/L]
Glucose	180	250	720
KH ₂ PO ₄	0,1	16	6,25
NH ₄ NO ₃	3	80	37,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1	20	50
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5	200	25
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,00167	0,3	5,56
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,008	1,6	5
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,015	3	5
H ₂ O _{Millipore}			ad. 1 L

3.1.5 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung wurde in 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen, Überfallkappe und 100 mL Füllvolumen durchgeführt. Das Medium wurde mit Sporen aus Submerskulturen (s. Kapitel 3.1.2, S. 23) angeimpft, sodass eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL erzielt wurde. Die Schüttelkolben wurden bei 33 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator mit einer Auslenkung von 50 mm inkubiert. Um Sauerstofflimitierungen bei der Probenahme zu verhindern, wurde jeder Schüttelkolben einzeln aus dem Inkubator entnommen und kontinuierlich per Hand weiter geschwenkt. Gravimetrisch wurde die Verdunstung zwischen zwei Probenahmepunkten bestimmt und durch die Zugabe von sterilem Reinstwasser ausgeglichen.

3.1.6 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Für die Kultivierung in Mikrotiterplatten wurden runde 96-Well Platten mit Deckel (steril, Sarstedt, Nümbrecht) verwendet und mit Parafilm verschlossen (Hevekerl et al., 2014a). Das Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.2, S. 25) wurde in einer sterilen Laborflasche angesetzt und mit $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL inokuliert. 100 µL des angeimpften Mediums wurden in jedes Well pipettiert. Pro Probenahmepunkt wurde jeweils eine Mikrotiterplatte verwendet, auf der jeweils ein Probentriplett angeordnet war. Die Platten wurden bei 33 °C und 950 rpm in einem Mikroti-

terplatteninkubator mit einem Schütteldurchmesser von 2,5 mm (ThermoShaker PST-60HL-4, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt) kultiviert.

3.1.7 Kultivierung im 1,5 L-Rührreaktor

Die Kultivierung im 1,5 L-Maßstab erfolgte in Glasrührreaktoren (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lenglern) (Abbildung 3.1), wobei bis zu vier baugleiche Reaktoren parallel betrieben werden konnten. Verschlossen wurde der Reaktor mit einem abnehmbaren Polyetheretherketon-Deckel, der mit einer Silikonringdichtung und einer Schelle auf dem Glasreaktor befestigt wurde. Im Deckel konnten Sauerstoff-, pH- und Redoxelektroden fixiert, sowie die Zuluft, die Abluft mit Rückflusskühler, eine Edelstahlrohrnadel als Probennahme und die Halterung für die Rührung montiert werden. Das Füllvolumen betrug 1 L und das Medium wurde mit einem hängenden Magnetrührstab (450 rpm) durchmischt. Die Reaktoren wurden mit einem externen Thermostaten über den Doppelmantel auf 35 °C temperiert. Die Onlinedaten wurden mit dem Modul PH4PO4RD4 DASGIP (Eppendorf GmbH, Jülich) aufgezeichnet und anschließend mittels der Software DASGIP Control (Eppendorf GmbH, Jülich) verarbeitet. Die Zugabe des pH-Korrekturmittels erfolgte über das Pumpenmodul MP8 (Eppendorf GmbH, Jülich). Alle verwendeten DASGIP-Module sind zur besseren Übersicht mit ihrer Funktion in Tabelle 3.3 aufgeführt. Zur Regelung des pH-Wertes wurde eine 6,25 % (v/v) Ammoniaklösung mittels Kanüle über ein Septum im Deckel in das Medium getropft. Sofern nicht anders angegeben, wurde eine Ammoniaklösung

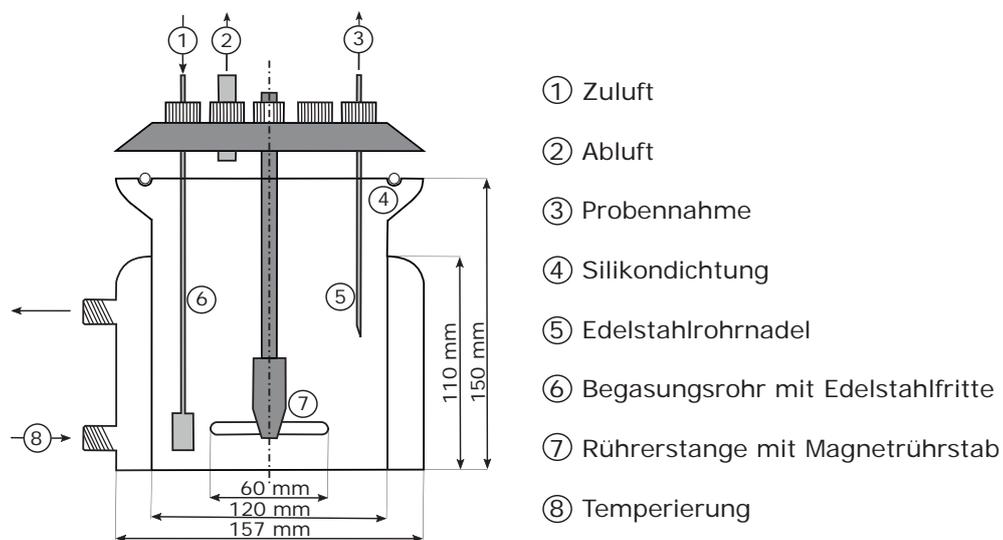


Abbildung 3.1 – Schematische Darstellung des 1,5 L-Rührreaktors mit Maßen.

Tabelle 3.3 – Verwendete Module von DASGIP (Eppendorf GmbH, Jülich) für die Kultivierung im 1,5 L-Bioreaktor zur Regelung und Datenaufzeichnung.

Bezeichnung	Typ
Datenaufnahme und Regelung von pH, Redox und pO ₂	PH4PO4RD4
Gasdurchflussmessung und Gasmischstation	MX4/4
Pumpenmodul	MP8
Software	DASGIP Control

von Fluka (ultra trace) verwendet. Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit dem Modul MX4/4 (Eppendorf GmbH, Jülich) auf 25 % mit Druckluft geregelt, indem der Gasfluss von 0 bis 40 L/h variiert wurde. Die Begasung erfolgte über eine Edelstahlfritte auf der ein Sterilfilter (0,22 µm) befestigt war.

Die Begasungsfritte wurde vor jeder Fermentation in 0,1 M NaOH für 3 h gereinigt. Der Elektrolyt der Sauerstoffelektrode wurde ausgetauscht, die Elektrode gereinigt und mindestens 6 Stunden polarisiert. Die pH-Elektrode wurde mit den Pufferlösungen pH 7,00 und pH 3,00 kalibriert und die Redoxelektrode mittels Redoxpuffer überprüft. Der Reaktor wurde mit dem Rührer, der Zu- und Abluft, sowie der Probennahme bestückt und die restlichen Deckelöffnungen mit Septen verschlossen. Der leere Reaktor wurde bei 1 bar Überdruck und 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Unter der Sterilbank wurde das Medium hineingegeben und die Sonden vor dem Einbau mit 70 % (v/v) Ethanol und sterilem Reinstwasser oberflächensterilisiert. Für die Nullpunktkalibrierung der Sauerstoffelektrode wurde das Medium auf 35 °C temperiert, mit 450 rpm gerührt und mit Stickstoff begast. Für die Kalibrierung der Steigung wurde anschließend die Begasung auf Luft umgeschaltet. Angeimpft wurde mit einer Sporenkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL und die Software gestartet. Nach etwa einem Tag, mit Einsetzen der Begasung, wurden 0,3 mL Antischaum (Ucolup N-115, Brenntag, Mühlheim/Ruhr) in das Medium gegeben.

3.1.8 Kultivierung im 15 L-Rührreaktor

Die Kultivierung wurde im 15 L-Rührreaktor (Biostat E, Braun Biotech International, Melsungen) (Abbildung 3.2) mit einem Füllvolumen von 10 L, 35 °C und 350 rpm (drei Rushton-Impeller) durchgeführt. Die Sauerstoffsättigung betrug 20-25 %, der Start-pH 3,1 und die Sporenkonzentration $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL. Über

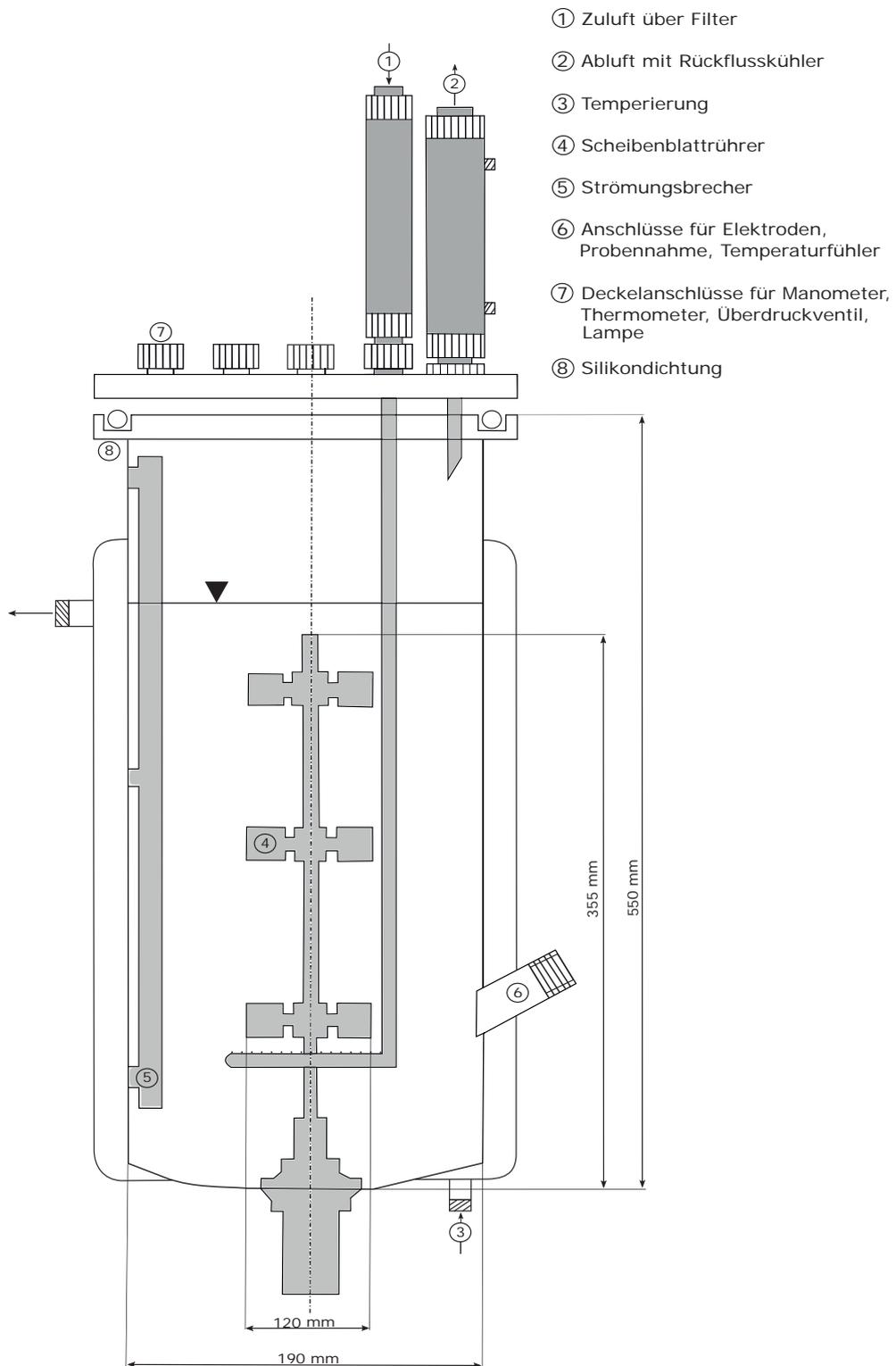


Abbildung 3.2 – Schematische Darstellung des 15 L-Rührreaktor mit Maßen.

die Schalttechnik des Reaktors wurden Temperatur, pO_2 und die Rührerdrehzahl geregelt. Die Regelung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte über die Variation des Zuluftstromes. Der pH-Wert, das Redoxpotenzial, der Sauerstoffpartialdruck, die Temperatur und die Rührerdrehzahl wurde mittels DASyLab 9.0 (measX GmbH & Co. KG, Mönchengladbach) aufgezeichnet.

Die pO_2 -Elektrode wurde vor dem Einbau gereinigt und der Elektrolyt gewechselt. Anschließend erfolgte eine mindestens 6-stündige Polarisierung. Die pH-Elektrode wurde mit den Pufferlösungen pH 7,00 und pH 3,00 kalibriert, die Redoxelektrode mittels Redoxpuffer überprüft und anschließend eingebaut. Der Reaktor wurde mit der Glucoselösung befüllt, der pH-Wert mit 0,5 M H_2SO_4 auf pH 3,1 eingestellt und bei 1 bar Überdruck bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Mit Erreichen der Sterilisationsphase wurde der Nullpunkt der Sauerstoffelektrode kalibriert. Die restlichen Medienkomponenten wurden in einer sterilen Laborflasche zusammengeführt und über einen Kopfanschluss in den Reaktor gegeben. Anschließend wurde bei 35 °C, 350 rpm und voll geöffnetem Zuluftventil die Steigung für die Sauerstoffelektrode kalibriert. Das Zuluftventil wurde wieder geschlossen, das Medium über die Probennahme angeimpft und die Datenaufnahme gestartet. Nach einem Tag wurde 1 mL Antischaum dem Medium hinzugegeben (Ucolup N-115, Brenntag, Mühlheim/Ruhr). Nach zwei Tagen wurde der pH-Wert auf pH 3 angehoben und manuell auf diesem Niveau mit einer 25 % (v/v) Ammoniaklösung (ultra trace, Fluka) gehalten, indem mit einer Spritze mit Kanüle die Ammoniaklösung durch ein Septum in das Medium getropft wurde.

3.1.9 Probennahme und Aufarbeitung

In regelmäßigen Abständen wurden die Schüttelkolben, Mikrotiterplatten und Bioreaktoren beprobt.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) in Schüttelkolben und Bioreaktoren wurden die verwendeten Reaktionsgefäße zuvor 48 Stunden bei 105 °C getrocknet, im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und auf einer Feinwaage gewogen. Aus den Schüttelkolben und dem Reaktor wurden 1,5 mL Probe entnommen und 1 mL in ein ausgewogenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde 25 Minuten bei 20 °C und mit 21.000 *g* zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, sowie der pH-Wert des Überstandes bestimmt. Das Zellpellet wurde zweimal in Reinstwasser resuspendiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden verworfen und das Pellet bei

105 °C 48 Stunden getrocknet. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut ausgewogen. Durch die Subtraktion des Leergewichts vom Endgewicht und anschließender Division durch das eingesetzte Volumen ergab sich die Biotrockenmasse. Die restliche Kulturflüssigkeit von 0,5 mL wurde für die Mikroskopie verwendet.

Bei der Mikrotiterplatte wurde der Inhalt der Wells ebenfalls in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und zwei der Proben 25 Minuten bei 20 °C und 21.000 g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in zwei neue Reaktionsgefäße pipettiert und der pH-Wert bestimmt. Die dritte Probe wurde mikroskopiert.

Die Überstände wurden bei -20 °C gelagert.

3.2 Kultivierung von *Ustilaginaceae*

In dieser Arbeit wurden die Stämme *Ustilago maydis* DSM 17144 und *Ustilago maydis* DSM 3121 der DSMZ (Braunschweig) verwendet. *Ustilago rabenhorstiana* NBRC 8995 und *Ustilago cynodontis* NBRC 9727 wurden über das Biological Resource Center NITE (NBRC, Tokyo, Japan) bezogen. Die Stämme *Pseudozyma antarctica* Y-7808, *Sporosorium cruentum* YB-512 und *Sporosorium elionuri* YB-336 sind in der Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL - Northern Regional Research Laboratory, Peoria, USA) hinterlegt. *Ustilago maydis* 67218, *Ustilago maydis* 67031, *Ustilago maydis* 69286, *Ustilago trichophora* 67067, *Ustilago scitaminea* 68265, *Ustilago ixophori* 69961 und *Ustilago phrygica* 67156 wurden vom Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen – Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik (Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung aller Hefestämme erfolge in Kryostockkulturen bei -80 °C in sterilem Glycerin (50 % (v/v)). Die Kulturen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und unter einer Sterilwerkbank mit einer Impföse entnommen. Mittels Verdünnungsausstrich wurde die Kultur auf eine YEPS-Agarplatte (s. Tabelle 3.4) ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Platten konnten anschließend für 3 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 3.4 – Zusammensetzung des YEPS-Mediums und -Agarplatten.

Substanz	Konzentration	
	[g/L]	
Saccharose	20	
Hefeextrakt	10	
Pepton	20	
Agar-Agar	20	optional

Die Vorkultur, die auch für die Herstellung von Kryostockkulturen verwendet wurde, bestand aus YEPS-Medium und wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Dazu wurden 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen und Überfallkappe mit 50 mL Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator mit 50 mm Auslenkung, bis eine optische Dichte von 10 bei 605 nm erreicht war, was einem Zeitraum von etwa 1-2 Tagen entsprach.

3.2.2 Mediumzusammensetzung

Die Kultivierung aller Hefen erfolgte in Tabuchi-Medium (Guevarra and Tabuchi, 1990), welches in Tabelle 3.5 aufgelistet ist. Alle Medienbestandteile wurden separat hergestellt und der pH-Wert auf pH 6 mit einer 0,5 M NaOH- oder 0,25 M H₂SO₄-Lösung eingestellt. Die einzelnen Medienkomponenten wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten sterilisiert. Eine Ausnahme stellte die Eisensulfatlösung dar, der pH-Wert wurde nicht korrigiert und die Lösung wurde sterilfiltriert. Das Medium wurde vor jeder Kultivierung aus den einzelnen Bestandteilen unter einer Sterilwerkbank zusammengemischt. Das Calciumcarbonat wurde in den jeweiligen Kultivierungssystemen vorgelegt und mit der Glasware autoklaviert.

Für die Untersuchung weiterer Substrate wurde die Glucose gegen die jeweilig genannte Kohlenstoffquelle ausgetauscht. Bei Inhibierungsversuchen wurde die Enzymmischung, Ameisen-, Essig- oder Lävulinsäure, HMF oder Furfural dem Medium hinzugefügt und der pH-Wert auf pH 6 korrigiert.

Tabelle 3.5 – Tabuchi-Medium zur Kultivierung der Hefen nach Guevarra and Tabuchi (1990).

Substanz	c_{Standardmedium} [g/L]	c_{Stammlösung} [g/L]	Volumen [mL/L]
Glucose	100	250	400
KH ₂ PO ₄	0,5	20	25
NH ₄ Cl	1,6	20	80
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	20	10
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,00001	0,01	1
Hefeextrakt	1	20	50
CaCO ₃	30		
H ₂ O _{Millipore}			ad. 1 L

3.2.3 Kultivierung in Reagenzgläsern

Für das Screening und die Inhibierungsversuche wurden die Kultivierungen in kurzen Reagenzgläsern (ø 16 mm x 100 mm) mit Kapsenberg-Kappen und 2 mL Tabuchi-Medium (Tabelle 3.5) durchgeführt. Als Inokulum wurde 1 % (v/v) der YEPS-Vorkultur verwendet (Kapitel 3.2.1). Die Reagenzgläser wurden 4 Tage bei 30 °C und 120 rpm in einem schrägen Reagenzglasalter mit einem Neigungswinkel von 30° inkubiert.

3.2.4 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat wurde in 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen und Überwurfkappe durchgeführt. Das Calciumcarbonat wurde im Kolben vorgelegt und mit diesem für 20 Minuten und 1 bar Überdruck bei 121 °C sterilisiert. *U. maydis* DSM 17144 wurde in 50 mL Tabuchi-Medium (Tabelle 3.5) und *U. rabenhorstiana* NRBC 8995 in 100 mL Tabuchi-Medium bei 30 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator mit 50 mm Auslenkung kultiviert. Zum Animpfen wurde 1 % (v/v) einer 24 h alten Vorkultur mit OD₆₀₅=10 verwendet.

3.2.5 Probennahme und Aufarbeitung

Nach 4 Tagen wurden die Reagenzgläser beprobt. Aus den Schüttelkolben wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe entnommen. Vor der Probenentnahme wurde gravimetrisch die Verdunstung zwischen dem Startpunkt und dem Probenahmepunkt bzw. zwischen zwei Probenahmepunkten bestimmt und durch die Zugabe von sterilem Reinstwasser ausgeglichen. Aus den Kultivierungssystemen wurden 1 mL und 0,5 mL Probe entnommen und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Das Reaktionsgefäß mit 1 mL Probe wurde 10 Minuten mit 21.000 *g* zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der pH-Wert des Überstandes wurde bestimmt und der Überstand bei -20 °C bis zur Vermessung gelagert. Die zweite Probe mit 0,5 mL wurde für mikroskopische Aufnahmen verwendet.

3.3 Weizenkaff

Es wurde Weizenkaff der Weizensorte Elixer verwendet. Der Weizen wurde in Adenstedt in 2014 und 2015 geerntet. Das Weizenkaff wurde bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.1 Bestimmung der Weizenkaffzusammensetzung

Die Charakterisierung des Weizenkaffs wurde nach dem technischen Report des NREL (National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA) durchgeführt (Sluiter et al., 2008).

Bestimmung der Trockenmasse

Der Wasseranteil des Weizenkaffs wurde gravimetrisch ermittelt. Dazu wurde 1 g Weizenkaff 24 Stunden bei 105 °C gelagert und das Gewicht erneut bestimmt. Die Differenz der Proben entsprach dem prozentualen Wasseranteil.

Bestimmung des Kohlenhydratanteils

Die Strukturkohlenhydrate wurden mittels eines Aufschlusses bestimmt. Dazu wurden 0,3 g des Weizenkaffs in 100 mL-Laborflaschen eingewogen und mit

einem Magnetrührstab versehen. Die Proben wurden mit 3 mL einer 72%igen Schwefelsäure versetzt und gut durchmischt. In einem Wasserbad wurden die Proben für 60 Minuten auf 30 °C erwärmt und alle 5 Minuten durchmischt. Anschließend wurden die Proben mit 84 mL Reinstwasser verdünnt, vermischt und 60 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Ansätze über einen Glasfaserfilter (Porengröße 1,2 µm) gegeben, 5 mL der gefilterten Probe mit einer 1 M NaOH-Lösung neutralisiert (pH 7), mit Reinstwasser entsprechend der zu erwartenden Zuckerkonzentrationen verdünnt und mittels HPAEC-PAD analysiert (Kapitel 3.4.3, S. 39).

Bestimmung des Ligninanteils

Der Filtrerrückstand der Kohlenhydratbestimmung wird als säureunlöslicher Rückstand bezeichnet. Nach Sluiter et al. (2008) ist dieser Rückstand vereinfacht als Lignin anzugeben. Der Rückstand wurde 3 Tage bei 45 °C getrocknet und ausgewogen.

Bestimmung des Ascheanteils

Der getrocknete Filtrerrückstand (Lignin) wurde bei 550 °C für 8 Stunden in einem Muffelofen (MR206E, Heareaus, Hanau) verascht und anschließend ausgewogen.

3.3.2 Vorbehandlung

Das Weizenkaff wurde mit einer Messermühle (Grindomix GM 200, Retsch, Hanau) vorgemahlen. Dieses Weizenkaff wurde daraufhin mittels Ultrazentrifugalmühle (ZM 200, Retsch, Hanau) auf eine Partikelgröße von ≤ 1 mm zerkleinert. Dazu wurde ein 24-Zahn-Rotor mit einem Ringsieb der Lochweite 1 mm bei einer Drehzahl von 18.000 rpm verwendet.

Für die alkalische Vorbehandlung wurden 60 g des zerkleinerten Weizenkaffs in eine 1 L Laborflasche gegeben und mit 540 mL einer 0,25 M NaOH-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde für drei Tage bei Raumtemperatur und 60 rpm geschüttelt (Auslenkung 50 mm). Das vorbehandelte Weizenkaff wurde bei 4.600 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Abtrennung von Acetat und Liginabbauprodukten wurde das vorbehandelte Weizenkaff mit 540 mL Reinstwasser gewaschen. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt, bis der

Überstand klar war. Anschließend wurde das Weizenkaff auf einem Sieb bei 45 °C für 2 Tage getrocknet. Das vorbehandelte Weizenkaff wurde bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

3.3.3 Enzymatische Hydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse von Weizenkaff wurde die Enzymmischung Biogazyme 2x (ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel) verwendet. Es wurden 10 FPU/g_{Biomasse} und ein Feststoffanteil von 10 % (w/v) vorbehandeltem Weizenkaff in Reinstwasser eingesetzt. Das vorbehandelte Weizenkaff wurde in 250 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 100 mL bei 50 °C und 120 rpm für 7 Tage hydrolysiert. Der pH-Wert wurde mit 0,5 M Schwefelsäure auf pH 4,8 eingestellt und während der Hydrolyse nicht korrigiert. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und diese bei 100 °C für 10 Minuten im Wasserbad zur Denaturierung der Enzyme erwärmt. Die Proben wurden bei 21.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Monosaccharidkonzentrationen wurden die Überstände mittels HPAEC-PAD analysiert (Kapitel 3.4.3, S. 39).

3.3.4 Eindampfen und Aufreinigung des Weizenkaffhydrolysats

Das erhaltene Weizenkaffhydrolysat (Kapitel 3.3.3) wurde für 30 Minuten bei 4.600 g zentrifugiert und der Feststoff verworfen (Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der Überstand wurde offen in einem Ofen bei 105 °C für 4 Stunden gelagert und so auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens durch Evaporation einreduziert. Um das Rohhydrolysat zu erhalten, wurde der ausfallende Feststoff mittels Zentrifugation bei 4.600 g für 30 Minuten abgetrennt und verworfen.

Zur Reduzierung der Kationenkonzentration im Rohhydrolysat wurde das Rohhydrolysat über eine Säule (450 mm x 25 mm) mit einem Kationenaustauscherharz (Dowex 50W-X8, 100/200-mesh, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben. Der pH-Wert des aufgereinigten Hydrolysats wurde für die Kultivierung mit *A. terreus* mit einer 4 M NaOH-Lösung auf pH 3,1 eingestellt. Das aufgereinigte Hydrolysat wurde vor der Anwendung im SHF sterilfiltriert.

Zur Aufreinigung des Rohhydrolysats mit Aktivkohle wurde Norit ROX 0.8 (Cabot Corporation, Boston, USA) verwendet. 25 mL des Rohhydrolysats wurden mit 2 g der Aktivkohle in einem Becherglas mit Magnetrührstab versetzt und bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Die Aktivkohle wurde anschließend über einen Blaubandfilter entfernt.

3.3.5 Simultane Verzuckerung und Fermentation

Für die Simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF) von Weizenkaff mit *A. terreus* wurde das Weizenkaff, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, vorbehandelt. Es wurden 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen und Überfallkappe mit einem Füllvolumen von 100 mL verwendet. Der Feststoffanteil des vorbehandelten Weizenkaffs betrug 10 % (w/v). Das vorbehandelte Weizenkaff wurde als Kohlenstoffquelle in das Kultivierungsmedium ohne Glucose (Kapitel 3.1.4, S. 24) mit 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x (ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel) gegeben und der pH-Wert auf pH 3,1 korrigiert. Der Ansatz wurde mit $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL inokuliert und bei 33 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator mit einer Auslenkung von 50 mm kultiviert.

3.3.6 Separate Verzuckerung und Fermentation

Für die Separate Verzuckerung und Fermentation mit *A. terreus* wurde das Weizenkaffhydrolysat aus den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.4 verwendet. Dazu wurden 100 mL Hydrolysat (pH 3,1) mit den Medienbestandteilen (Kapitel 3.1.4, S. 24) ohne Glucose gemischt und in 250 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen und Überfallkappe gegeben. Das Inokulum betrug $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL. Die Kultivierung erfolgte bei 33 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator mit einer Auslenkung von 50 mm.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Fettsäurebestimmung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Koppelung

Intrazelluläre Lipide wurden über eine Umesterung zu Fettsäuremethylestern (FAME, englisch fatty acid methylester) nach einer modifizierten Methode nach Lewis et al. (2000) bestimmt. Die Biomasse wurde am Ende der Kultivierung mittels Zentrifugation (21.000 g, 20 Minuten, Raumtemperatur) vom Medium getrennt. Das Pellet wurde in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und das Pellet wieder in NaCl-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und mittels Ultraschallsonicator (Sonopuls HD2200 mit Sonotrode Typ UW2200, Bandelin electronic, Berlin) aufgeschlossen. Es wurden vier Zyklen von 15 Sekunden bei 65 % durchgeführt. Die Pausen zwischen den Zyklen betragen 30 Sekunden. Die Suspension wurde bei -80 °C über Nacht tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet (Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode).

In ein Reagenzglas mit Schraubdeckel und Gummistopfen wurden 50 mg der aufgeschlossenen und getrockneten Biomasse, 100 µL eines internen Standards (2,9 g/L Heneicosansäure, gelöst in Chloroform) gegeben und mit 3 mL der Umesterungsreaktionsmischung (H₂SO₄/Chloroform/Methanol - 1:3:30 (v/v)) vermischt. Die Mischung wurde bei 90 °C für 90 Minuten erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, 1 mL Wasser hinzugefügt und durchmischt. Die Fettsäuremethylester wurden durch die Zugabe von 2 x 1,5 mL Chloroform/n-Hexan (1:4 (v/v)) extrahiert. Dazu wurde die Probe nach der Zugabe des Extraktionsgemisches durchmischt und die obere Phase abgenommen. Durch die Zugabe von wasserfreiem Na₂SO₄ wurde die Probe getrocknet und anschließend 1:10 mit n-Hexan verdünnt.

Die Proben wurden mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID 17A, Shimadzu, Kyoto, Japan) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GCMS-QP5050A, Shimadzu, Kyoto, Japan) analysiert. Dazu wurde eine Kapillarsäule (ZB-Waxplus, 60 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke, Phenomenex, Rorrance, USA) genutzt, wobei die Temperatur an der Einspritzöffnung 250 °C und im Detektor 300 °C betrug. Die Stromteilungsrate betrug 52:1 unter Verwendung von Helium als Trägergas (1,4 mL/min) und einem Injektionsvolumen von 1 µL. Die Ofentemperatur wurde mit einer Rate

von 30 °C/min von 60 °C auf 150 °C angehoben, anschließend mit einer Rate von 13 °C/min auf 240 °C gesteigert. Die Temperatur von 240 °C wurde für 30 Minuten gehalten, es folgte eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 255 °C für 5 Minuten. Die Identifikation der FAME erfolgte über die Software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japan) mittels eines Multielementstandards (Supelco Compound FAME Mix, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Zusätzlich wurden die Massenspektren mit der Datenbank des National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA) abgeglichen.

3.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Um die Konzentrationen von Glucose, Itaconsäure und Nebenprodukten bestimmen zu können, wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, englisch high-performance liquid chromatography) angewendet. Im verwendeten System (Tabelle 3.6) war eine HPX-87H-Säule (300 x 7,8 mm, 9 µm Partikelgröße) eingebaut, wobei 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel genutzt wurde. Die Säule trennt dabei die Substanzen in der Probe durch eine Kombination von Ionenaustausch und Größenaustauschchromatographie auf. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40 °C und die Flussrate des Laufmittels 0,6 mL/min. Die Substanzen wurden mittels UV/Vis-Detektor (210 nm) und Refractive index (RI) Detektor bestimmt. Das Volumen der Probenschleife betrug 10 µL und die Laufzeit 20 Minuten. Zur Kalibrierung der HPLC wurden in regelmäßigen Abständen externe Standards genutzt. Die Proben wurden mit Reinstwasser entsprechend

Tabelle 3.6 – Geräte des HPLC-Systems.

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Autosampler	Marathon 816	Spark Holland B.V., Emmen, Niederlande
Degasser	DG-1300	Uniflows, Tokyo, Japan
Pumpe	LC-10AT	Shimadzu, Kyoto, Japan
Säule	HPX-87H-Säule	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Säulenofen	JetstreamII Plus	Knauer, Berlin
RI-Detektor	RID-6A	Shimadzu, Kyoto, Japan
UV-Detektor	S3310	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck
Software	Clarity 6.0	DataApex, Prag, Tschechien

der zu erwartenden Itaconsäurekonzentration verdünnt, sodass das Signal des UV-Detektors im linearen Bereich der Kalibrierung lag.

3.4.3 Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischen Detektion

Mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC, englisch high-performance anion-exchange chromatography) gekoppelt mit einer gepulsten amperometrischen Detektion (PAD) wurden die Monosaccharide analysiert. Hierzu wurde das System Dionex ICS 5000 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) verwendet (Tabelle 3.7). Als Eluent wurden Reinstwasser, 10 mM Natriumhydroxidlösung, 200 mM Natriumhydroxidlösung und eine 1 M Natriumacetat-25 mM Natriumhydroxid-Lösung mit einer Flussrate von

Tabelle 3.7 – Geräte des HPAEC-PAD-Systems Dionex ICS 5000 von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA).

Bezeichnung	Typ
Autosampler	AS-AP
Detektor	ED, Gold Standard PAD, pH-Sonde
Pumpe	DP
Säule	Carbopac PA20, 3 x 150 mm, Microbore Separator
Säulenofen	DC
Vorsäule	Carbopac PA20, 3 x 30 mm, Microbore Guard
Software	Chromeleon 7

Tabelle 3.8 – Gradient des Eluenten zur Bestimmung der Monosaccharidkonzentrationen mittels HPAEC-PAD.

Zeit	Wasser	10 mM NaOH	200 mM NaOH	1 M NaOAc + 25 mM NaOH
0-29 min	50 %	50 %		
30 min	50 %		50 %	
40 min	10 %		50 %	40 %
43 min			10 %	90 %
43,5 min			100 %	
55-72 min	50 %	50 %		

0,4 mL/min verwendet. Das Profil des Gradienten ist in Tabelle 3.8 beschrieben. Die Proben wurden mit Reinstwasser verdünnt. Die Messung von 10 µL Probe wurden bei 30 °C durchgeführt. Um die Bildung von Natriumcarbonat zu verhindern, wurden die Eluenten mit Helium begast. Bei jeder Messung wurde ein externer Monosaccharid-Multistandard mit vermessen.

3.4.4 Ionenchromatographie

Die Konzentrationen von Phosphat, Ammonium und Nitrat wurden mittels Ionenchromatographie (IC) ermittelt. Verwendet wurde eine Dionex ICS-100 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), welche aus dem Autosampler AS40 und zur parallelen Bestimmung von Anionen und Kationen aus jeweils zwei Probenschleifen, Pumpen, Suppressoren und Leitfähigkeitsdetektoren bestand. Die Betriebsparameter für die Bestimmung von Anionen und Kationen sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Für die Kalibrierung wurde ein Kationen- und Anionenmultielementstandard von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) verwendet. Die Proben wurden mit Reinstwasser in 5 mL Dionex Polyvials (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verdünnt und mit Filtercaps verschlossen.

Tabelle 3.9 – Parameter zur Bestimmung von Kationen und Anionen mittels Dionex ICS-100 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

	Anionen	Kationen
Vorsäule	IonPac AG11-HC, 4 x 50 mm	IonPac CG16, 5 x 50 mm
Säule	IonPac AS11-HC, 250 x 4 mm	IonPac CS, 250 x 5 mm
Eluent	1 mL/min 25 mM NaOH	1 mL/min 36 mM Methylsulfonsäure
Temperatur	RT	60 °C
Suppressor	ASRS 300 4 mm, 62 mA	CSRS 300 4 mm, 106 mA
Software	Chromeleon 7	

3.4.5 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Mangan und andere Spurenelemente wurden mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES, englisch inductively coupled plasma-optical emission spectrometry) analysiert. Verwendet wurde eine iCAP

6300 Duo (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). In einem Messkolben aus PMP wurde die Probe mit 6 mL konzentrierter Salpetersäure Suprapur und 2 mL Wasserstoffperoxid Suprapur versetzt und mit Reinstwasser verdünnt. Das ICP-OES System bestand aus einem konzentrischen Glaszerstäuber, einer Glaszyklon-Sprühkammer, einem 2 mm Bor-Quarz-Injektor und einer CCD-Kamera. Stickstoff 5.0 wurde als Spülgas und Argon 4.8 als Plasmagas verwendet. Die Plasmaleistung betrug 1,35 kW bei einem Zerstäubergasstrom von 0,5 L/min (UV) und 1,15 kW bei einem Zerstäubergasstrom von 0,65 L/min (Vis). Es wurde eine Spül- und Analysenpumprate von 50 U/min gewählt. Für die Kalibrierung wurde ein Multielementstandard verwendet (28 Elemente + Phosphor + Schwefel + Wolfram, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe). Tabelle 3.10 zeigt die Elemente mit zugehöriger Wellenlänge und Messmodus.

Tabelle 3.10 – Ermittelte Elemente mittels ICP-OES mit zugehöriger Wellenlänge und Messmodus.

Element	Wellenlänge	Modus	Element	Wellenlänge	Modus
Ag	328,068 nm	axial	Mn	293,930 nm	axial
Al	396,152 nm	radial	Mo	202,030 nm	axial
As	189,042 nm	axial	Na	589,593 nm	radial
B	249,773 nm	axial	Ni	231,604 nm	axial
Ba	455,403 nm	radial	P	177,495 nm	axial
Be	234,861 nm	radial	Pb	220,353 nm	axial
Bi	223,061 nm	axial	S	182,034 nm	axial
Ca	422,673 nm	radial	Sb	217,581 nm	axial
Cd	214,438 nm	axial	Se	203,985 nm	axial
Co	228,616 nm	axial	Sr	407,771 nm	radial
Cr	267,716 nm	axial	Ti	337,280 nm	axial
Cu	324,754 nm	axial	Tl	190,856 nm	axial
Fe	259,940 nm	axial	V	292,464 nm	axial
K	766,490 nm	radial	W	239,709 nm	axial
Li	670,784 nm	radial	Zn	206,200 nm	axial
Mg	280,270 nm	radial			

3.4.6 Bestimmung der Cellulaseaktivität

Die Bestimmung der Cellulaseaktivität bei optimalen Reaktionsbedingungen für Biogazyme 2x (50 °C, pH 4,8 nach Anders (2014)) bzw. Kultivierungsbedingungen von *A. terreus* (33 °C, pH 3,1) erfolgte nach Ghose (1987). Das Enzym wurde in einem 0,05 M Natriumcitratpuffer gelöst. Zur Bestimmung der Cellulaseaktivität wurde ein Whatman No. 1 Filterpapierstreifen (1 x 6 cm) als Substrat verwendet. Das Filterpapier wurde aufgerollt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 900 µL 0,05 M Natriumcitratpuffer gegeben. Das Filterpapier wurde kurz heruntergedrückt und die Reaktionsgefäße in einem Thermoschüttler für 10 min mit 200 rpm auf Reaktionstemperatur gebracht (MKR13 Thermoschüttler, HLC Biotech, Bovenden). Unterschiedliche Enzymkonzentrationen, abhängig von der zu erwartenden Cellulaseaktivität, wurden ebenfalls erwärmt. Anschließend wurden 100 µL der Enzymlösungen in die 1,5 mL Reaktionsgefäße mit Filterpapier gegeben. Die Proben wurden 60 min bei 200 rpm inkubiert. Zur Denaturierung der Enzyme wurde die Probe für 10 Minuten auf 100 °C erhitzt und danach für 5 Minuten bei 21.000 *g* zentrifugiert. Zur Bestimmung der Glucoseäquivalente und der daraus resultierenden FPU (Filter Paper Units) nach Ghose (1987), wurde der Überstand verwendet. Zusätzlich wurden bei jeder Aktivitätsbestimmung Glucosestandards, ein Enzym- und ein Substratblank untersucht (s. Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 – Herstellung von Blanks und Standards in 0,05 M Natriumacetatpuffer zur Bestimmung der Cellulaseaktivität.

Standard	Enzymblank	Substratblank
0,1 mL Glucoselösung		Filterpapierstreifen
	0,1 mL Enzymlösung	
0,9 mL Puffer	0,9 mL Puffer	1 mL Puffer

3.4.7 Bestimmung von Glucoseäquivalenten mittels DNS-Reagenz

3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) reagiert mit reduzierenden Enden von Zuckermolekülen zu dem Farbstoff 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure und kann photometrisch bei 540 nm bestimmt werden (Miller, 1959). Dabei korreliert die Anzahl der durch enzymatische Hydrolyse kontinuierlich entstehenden Oligo- und Monosaccharide mit der Anzahl reduzierender Enden. Mittels Kalibriergerade im Bereich von

0,5 g/L bis 2 g/L Glucose, wurde die Konzentration von Glucoseäquivalenten bestimmt. Proben, Standards, sowie Enzym- und Substratblanks wurden mit 400 μL DNS-Reagenz (s. Tabelle 3.12) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vermischt und in einem Wasserbad auf 100 °C für 5 Minuten erhitzt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend auf Eis gelagert. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 200 μL pro Ansatz in eine 96-Well Mikrotiterplatte gegeben und bei 540 nm vermessen (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Oldenburg). Bei Extinktionen $> 1,0$ wurden die Proben mit Reinstwasser verdünnt. Die Glucoseäquivalente wurden nach Abzug der Extinktion von Enzym- und Substratblank von der Probenextinktion mittels Kalibriergerade bestimmt und die FPU nach Ghose (1987) berechnet. Dabei ist die Einheit der FPU $\mu\text{mol}_{\text{Glucose}} / (\text{mL} \cdot \text{min})$.

Tabelle 3.12 – Zusammensetzung der DNS-Reagenz.

1,77 g	3,5-Dinitrosalicylsäure	
3,37 g	NaOH	
in 236 mL	Millipore-Wasser	lösen
51,06 g	Rochelle Salze (K-Na Tartarat)	
1,38 g	Na-Metabisulfit	zugeben

3.4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet, welches in 0,01 M Kaliumacetatpuffer (pH 5,5) gelöst wurde. Eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0,025 g/L bis 1 g/L wurde erstellt. Die Proben wurden entsprechend der Proteinkonzentration mit 0,01 M Kaliumacetatpuffer verdünnt. Im Verhältnis 1:31 wurden Probe bzw. Standard in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit Bradfordreagenz versetzt, vermischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. 200 μL jedes Ansatzes wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 595 nm (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Oldenburg) bestimmt. Die Extinktion wurde mithilfe der erstellten Kalibriergeraden und der Software Omega-Data Analysis 3.01 (BMG Labtech, Oldenburg) für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

3.4.9 Mikroskopie

Mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss-Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen) wurden die Zellen regelmäßig untersucht. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte über die Software analySIS pro 5.1 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg).

Intrazelluläre Lipide wurden mittels einer Nilrot-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Greenspan et al., 1985). Die Zellsuspension wurde 5:1 (v/v) mit einer 0,1 g/L Nilrotlösung in Aceton vermischt und 5 Minuten im Dunklen inkubiert. Zuerst wurde ein Bild im Phasenkontrast aufgenommen und danach mittels Auflicht und Filter (Filter Set 09, Carl Zeiss AG, Oberkochen) ein weiteres Fluoreszenzmikroskopiebild gemacht. Diese beiden Bilder konnten anschließend nebeneinandergelegt werden und die intrazellulären Lipide fluoreszierten rot-orange.

3.4.10 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten für Itaconsäure wurden mittels Titration der Fermentationsbrühe aus einer Standardkultivierung im 1,5 L-Bioreaktor mit pH-Regelung (Kapitel 3.1.7, S. 26) bei 35 °C bestimmt. Es wurde ein automatischer Titrator (Titroline alpha, Schott Instruments, Hofheim) mit einer 0,1 M KOH-Lösung verwendet. Die Titration wurde mit der Software Titrisoft 2.6 (Schott Instruments, Hofheim) aufgezeichnet und die Äquivalenzpunkte ermittelt. Die pK_S -Werte wurden an den Halbäquivalenzpunkten bestimmt und für die Bestimmung der Dissoziationsgrade mit CurTiPot 4.2.3 (Gutz, 2016) verwendet.

In dieser Arbeit wurden die undissoziierte Itaconsäure als H_2IA , die einfach-dissoziierte Form HIA^- und die zweifach-dissoziierte Form als IA^{2-} bezeichnet. Wird der Begriff Itaconsäure verwendet, ist die Summe aller Dissoziationsformen gemeint und entspricht der gemessenen Itaconsäurekonzentration mittels HPLC (Kapitel 3.4.2, S. 38).

3.5 Datenauswertung

Produktivität

Die Produktivität einer Kultivierung ist der Quotient aus Produktkonzentration und der dafür benötigten Kultivierungszeit. Die Berechnung ist in Gleichung 3.2 beschrieben.

$$Pr = \frac{\Delta c_{IA}}{\Delta t} \quad (3.2)$$

- Pr – Produktivität [g/(L·h)]
- c_{IA} – Itaconsäurekonzentration [g/L]
- t – Zeit [h]

Maximale Produktivität

Zur Bestimmung der maximalen Produktivität (Pr_{max}) wurde die Software OriginPro2015 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) verwendet. Für die Itaconsäureproduktionskurve wurde eine Regressionskurve nach der Hill-Funktion ermittelt und die Steigung der Kurve durch die erste Ableitung ermittelt. Das Maximum der Ableitung entspricht der maximalen Produktivität in g/(L·h).

Ausbeute

Die Ausbeute ist die erzielte Produktkonzentration bezogen auf die verbrauchte Substratkonzentration und wird durch den Produktausbeutekoeffizienten beschrieben (Gleichung 3.3).

$$Y_{P/S} = \frac{c_{IA_t}}{c_{S_0} - c_{S_t}} \quad (3.3)$$

- $Y_{P/S}$ – Produktausbeutekoeffizient [w/w]
- c_{IA_t} – Itaconsäurekonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]
- c_{S_0} – Ausgangssubstratkonzentration [g/L]
- c_{S_t} – Substratkonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Itaconsäureproduktion auf Basis von Lignocellulose

Vor Beginn der Kultivierung auf Substraten aus lignocellulosehaltiger Biomasse wurden neben der Verwendung von *Aspergillus terreus* nach weiteren itaconsäureproduzierenden Mikroorganismen gesucht, die lignocellulosehaltige Biomasse verwerten können. Anschließend wurden systematische Versuche mit verschiedenen reinen Zuckern durchgeführt.

4.1.1 Screening nach alternativen Itaconsäurebildnern

Neben dem industriell verwendeten filamentösen Pilz *A. terreus* sind bereits unterschiedlichste Hefen aus der Abteilung der *Basidiomycota* für die Itaconsäureproduktion bekannt (Guevarra and Tabuchi, 1990; Geiser et al., 2014). Laut Klement et al. (2012) soll die Handhabung dieser Mikroorganismen aufgrund ihrer Wachstumsform als Einzelzellen problemloser sein, als der Umgang mit dem filamentösen Pilz. Zusätzlich wird *A. terreus* als sensitiv gegenüber Verunreinigungen im Medium beschrieben (Kane et al., 1945; Batti and Schweiger, 1963; Lockwood and Reeves, 1946; Kobayashi, 1978), was den Einsatz von alternativen und kom-

Tabelle 4.1 – Screening-Übersicht über die Produktion von Itaconsäure (IA), Malat (MAL), Succinat (SUC) und Erythrit (ERY) nach 4 Tagen und 30 °C mit Tabuchi-Medium und 100 g/L Glucose als Substrat.

n.n. nicht nachgewiesen, 0–7 g/L +, 7–14 g/L ++, 14–21 g/L +++

Stamm	IA	MAL	SUC	ERY
<i>U. maydis</i> DSM 17144	+++	+	n.n.	n.n.
<i>U. maydis</i> DSM 3121	+++	++	n.n.	n.n.
<i>U. maydis</i> 67218	+++	+++	n.n.	n.n.
<i>U. rabenhorstiana</i> NBRC 8995	+++	n.n.	n.n.	n.n.
<i>U. maydis</i> 67031	+++	+++	+	n.n.
<i>U. cynodontis</i> NBRC 9727	++	+	n.n.	++
<i>P. antarctica</i> Y-7808	n.n.	n.n.	++	n.n.
<i>U. trichophora</i> 67067	n.n.	+++	+	n.n.
<i>S. cruentum</i> YB-512	n.n.	++	n.n.	+++
<i>S. elionuri</i> YB-336	n.n.	+++	+	n.n.
<i>U. scitaminea</i> 68265	n.n.	+	n.n.	+
<i>U. maydis</i> 69286	n.n.	+	n.n.	n.n.
<i>U. ixophori</i> 69961	n.n.	+++	+	n.n.
<i>U. phrygica</i> 67156	n.n.	n.n.	n.n.	+

plexen Polysacchariden erschweren könnte. Aus diesen Gründen wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Screening unterschiedlicher Hefen auf Glucose durchgeführt, um itaconsäureproduzierende Stämme auswählen, mit *A. terreus* vergleichen und Vor- und Nachteile der jeweiligen Stämme bei der Itaconsäureproduktion auf Substraten aus Lignocellulose herausarbeiten zu können.

Die Hefestämme wurden parallel unter den gleichen Bedingungen 4 Tage in geschüttelten Reagenzgläsern kultiviert und zeigten abhängig vom Stamm eine Produktmischung aus den organischen Säuren Itaconsäure, Äpfelsäure und Bernsteinsäure sowie dem Zuckeralkohol Erythrit (Tabelle 4.1). Zusätzlich wurde in allen Proben Fumarsäure in Konzentrationen von < 1 g/L nachgewiesen und zwei unbekannte Nebenprodukte in geringen Mengen. Hierbei handelte es sich vermutlich um Itaweinsäure, sowie Hydroxyparaconsäure, die von Guevarra and Tabuchi (1990) nachgewiesen wurden. In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden Säuren jedoch nicht eindeutig quantifiziert werden, da beide Substanzen als Reinform nicht verfügbar sind. Mittels mikroskopischer Untersuchungen konnte zusätzlich die Bildung von intrazellulären Lipiden nachgewiesen werden

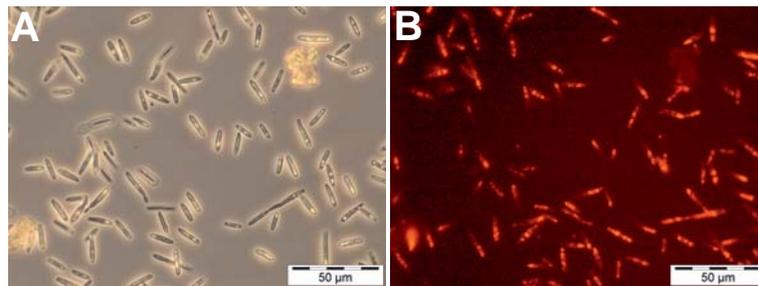


Abbildung 4.1 – A - Mikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* DSM 17144, B - Gefärbte Probe mit Nilrot, Lipideinschlüsse leuchten hellrot, kultiviert in Reagenzgläsern 125 rpm, 30 °C, 4 d, 400-fach vergrößert.

(s. Abbildung 4.1). Insgesamt zeigten sechs Stämme, die alle zur Gattung *Ustilago* zählen, die Bildung von Itaconsäure im Konzentrationsbereich von 7–21 g/L. Bei fünf Stämmen zeigte sich zusätzlich zur Itaconsäureproduktion die Bildung von Äpfelsäure, Bernsteinsäure oder Erythrit. Eine Ausnahme stellte der Stamm *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 dar, welcher unter den gewählten, nicht optimierten Bedingungen, keine zusätzlichen organischen Säuren oder Zuckeralkohole neben Itaconsäure produzierte. Insgesamt zeigte *U. maydis* DSM 17144 mit 20,4 g/L Itaconsäure und einer Ausbeute von 0,23 (w/w) im Vergleich zu allen itaconsäurebildenden Hefestämmen den höchsten Titer und die höchste Ausbeute. Der Titer von Itaconsäure mit *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 lag mit 15,9 g/L und einer Ausbeute von 0,18 (w/w) niedriger als bei *U. maydis* DSM 17144, obwohl als Nebenprodukte lediglich intrazelluläre Lipide nachgewiesen wurden. Im Vergleich mit *A. terreus* DSM 23081 (Abbildung 4.2), welcher 40 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,42 (w/w) innerhalb von vier Tagen bildete, sind die Titer und Ausbeuten aller Hefen um mehr als die Hälfte geringer. Jedoch lief die Kultivierung von *A. terreus* unter bereits optimierten Bedingungen nach Hevekerl et al. (2014a) in Mikrotiterplatten ab.

Mit *U. maydis* DSM 17144 erreichte Klement et al. (2012) im gleichen Medium unter nicht optimierten Bedingungen im Schüttelkolben 20 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,17 (w/w). Die Itaconsäurekonzentration von Klement et al. (2012) ist mit dem Ergebnis dieser Arbeit vergleichbar. Die erzielte Produktivität von Klement et al. (2012) lag dabei bei 0,27 g/(L·h) und war im Vergleich zu 0,21 g/(L·h) in dieser Arbeit leicht erhöht. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Kultivierungssysteme zurückzuführen. Unter optimierten Kultivierungsbedingungen ist es Maassen et al. (2014) gelungen mit *U. maydis* DSM 17144 nach vier Tagen einen Titer von etwa 38 g/L zu erzielen. Dieses

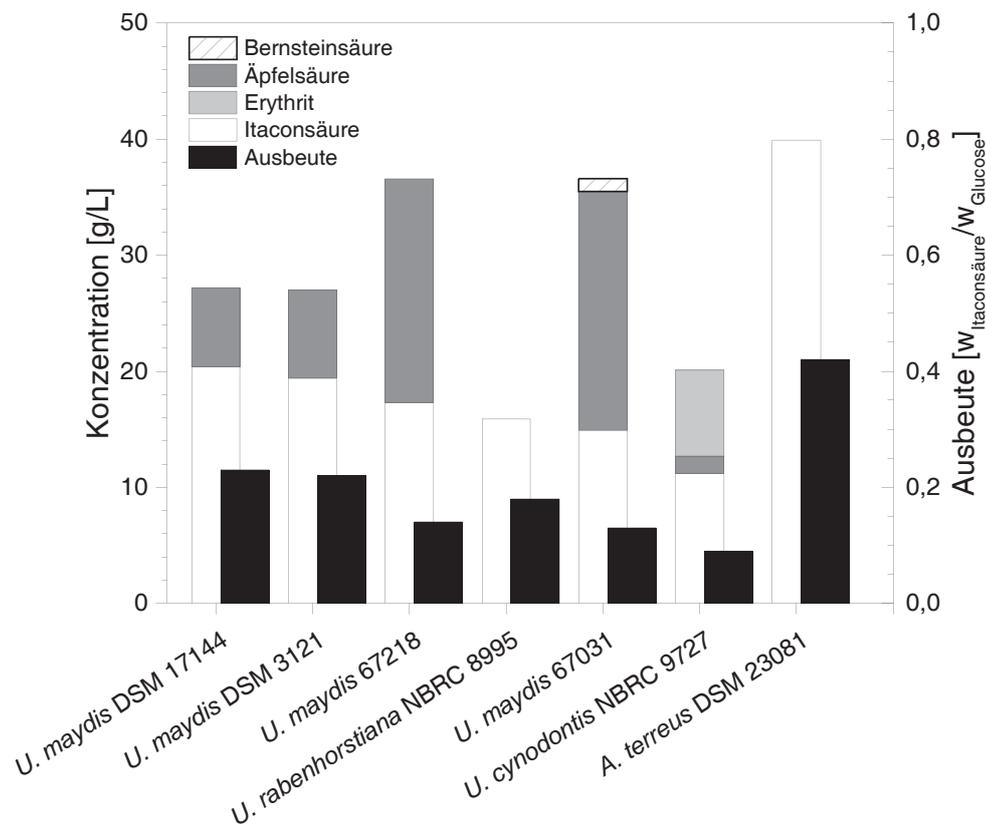


Abbildung 4.2 – Konzentrationen der organischen Säuren und Zuckeralkohole, sowie erzielte Itaconsäureausbeute beim Screening unterschiedlicher Hefen mit Tabuchi-Medium und Glucose als Substrat. Kultiviert in Reagenzgläsern bei 125 rpm, 30 °C, 4 d.

Ergebnis ist vergleichbar mit dem erzielten Titer von *A. terreus* DSM 23081 nach vier Tagen, der bei 40 g/L lag. Insgesamt erreichte Maassen et al. (2014) eine Endkonzentration von 44,5 g/L nach sechs Tagen. Dazu wurde *U. maydis* in einem Bioreaktor bei konstantem pH-Wert von pH 6 und einem Sauerstoffpartialdruck von 80 % kultiviert. Zusätzlich wurde die Glucosekonzentration von 120 g/L auf 200 g/L und die Ammoniumchloridkonzentration von 1,6 g/L auf 3,7 g/L angehoben. Jedoch konnte die Ausbeute von 0,24 (w/w) nicht deutlich gesteigert werden und entspricht der Ausbeute des in dieser Arbeit durchgeführten Screenings. Somit kann zwar die Itaconsäureproduktion durch eine Prozess- und Medienoptimierung gesteigert werden, jedoch bewegt sich die Ausbeute mit 0,2–0,3 (w/w) deutlich unter der von *A. terreus* mit 0,42 (w/w). Auch *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 wurde in der Literatur von Guevarra and Tabuchi (1990) als Itaconsäureproduzent beschrieben. Guevarra and Tabuchi (1990) wiesen auf dem gleichen Screeningmedium nach sieben Tagen etwa 17 g/L Itaconsäure, 10 g/L Erythrit, 13 g/L

Hydroxyparaconsäure und 5 g/L Itaweinsäure nach. Die erzielte Itaconsäurekonzentration entspricht dem erzielten Titer aus dem durchgeführten Screening mit 15,9 g/L dieser Arbeit, jedoch konnten die beschriebenen Nebenprodukte in diesen Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Bildung von intrazellulären Lipiden wurde beobachtet.

Es wurde die Entscheidung getroffen den besten Itaconsäureproduzenten aus dem Screening, *U. maydis* DSM 17144, und den Stamm mit der geringsten Konzentration an organischen Säuren und Zuckeralkoholen als Nebenprodukt, *U. rabenhorstiana* NBRC 8995, mit *A. terreus* zu vergleichen.

4.1.2 Verwertung von Monosacchariden aus lignocellulosehaltiger Biomasse

Ein weiteres Auswahlkriterium eines geeigneten Itaconsäureproduzenten auf lignocellulosehaltiger Biomasse ist die Verwertbarkeit der in Lignocellulose enthaltenen Monosaccharide. Dafür wurden das Wachstum und die Umsetzung der Hexosen Glucose, Mannose, Galactose und Fructose sowie der Pentosen Xylose und Arabinose, unabhängig voneinander, als Substratquellen getestet.

4.1.2.1 Zuckerverwertung *U. maydis*

Nach 4 Tagen Kultivierung von *U. maydis* bei 30 °C in Reagenzgläsern mit unterschiedlichen Monosacchariden als Kohlenstoffquelle zeigten sich deutliche Unterschiede in der Morphologie (s. Abbildung 4.3). Mit Glucose, Fructose, Xylose und Arabinose hatten sich typische haploide Einzelzellen vermehrt. Mit Glucose waren deutliche Zelleinschlüsse von Lipiden zu erkennen, dabei machten die Fettsäuren C16:0, C18:1n9trans und C18:2n6trans 75 % aller Fettsäuren der Zelle aus. Die genaue Zusammensetzung der Fettsäuren der Zellen kann dem Anhang entnommen werden (s. Anhang B.2, S. 163). Auch mit Fructose bildeten sich intrazelluläre Lipide. Eine Art Pelletstruktur mit langen Hyphen bildete sich mit Mannose. Auch mit Galactose entstand ein Hyphengeflecht, welches jedoch nicht so dicht war wie mit Mannose. Das Wachstum auf Rhamnose konnte nicht nachgewiesen werden.

Zwar konnte auf sechs Substraten Biomasse gebildet werden, doch nur Glucose, Fructose und Mannose konnten zur Itaconsäurebildung verwendet werden. Für Glucose konnte mit einer Produktivität von 0,13 g/(L·h) und einer Ausbeute von

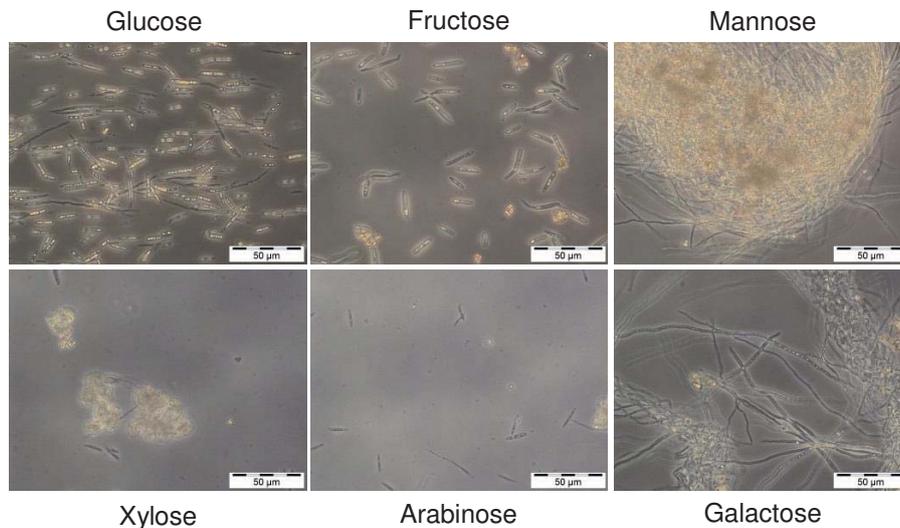


Abbildung 4.3 – Übersicht der Morphologie von *U. maydis* auf unterschiedlichen Zuckermolekülen als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO₃, 200-fach vergrößert.

0,15 (w/w) das beste Ergebnis erzielt werden. Die Produktivität und Ausbeute von Mannose und Fructose lagen in einem ähnlichen Bereich mit 0,09 g/(L·h) und einer Ausbeute von 11 %. Mit Xylose, Arabinose und Galactose konnte keine Itaconsäure nachgewiesen werden und der anfängliche pH-Wert von pH 6,7 war auf pH 7 angestiegen. Im Fall der Itaconsäurebildung mit Glucose, Fructose und Mannose fiel der pH-Wert auf in einen pH-Bereich von pH 5,4–5,7.

Das Wachstum von *U. maydis* (De Candolle) Corda 1842 ist auf Glucose, Arabinose, Rhamnose und Xylose in Flüssigmedium beschrieben, dagegen konnte auf Galactose keine Biomassebildung von Boekhout (2011) nachgewiesen werden. Somit besteht eine Abweichung zum verwendeten Stamm *U. maydis* DSM 17144, der kein Wachstum auf Rhamnose zeigte, dafür aber auf Galactose. Zudem beschreibt Boekhout (2011) auch die Bildung von Lipidtröpfchen innerhalb der Zellen. Zur Produktion von Itaconsäure auf alternativen Zuckern beschreiben Klement et al. (2012) und Maassen et al. (2014) mit dem gleichen Stamm, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, die Bildung von Itaconsäure auf Xylose. Dabei hebt Klement et al. (2012) hervor, dass das Wachstum und die Produktion mit Xylose deutlich geringer sind als mit Glucose. Maassen et al. (2014) erzielt einen Titer von 27,5 g/L Itaconsäure auf Xylose unter optimierten Bedingungen im Bioreaktor, wobei auch die Bildung von Lipiden beschrieben wird. Jedoch ist laut Maassen et al. (2014) für die Bildung von Itaconsäure auf Xylose eine Vorkultur

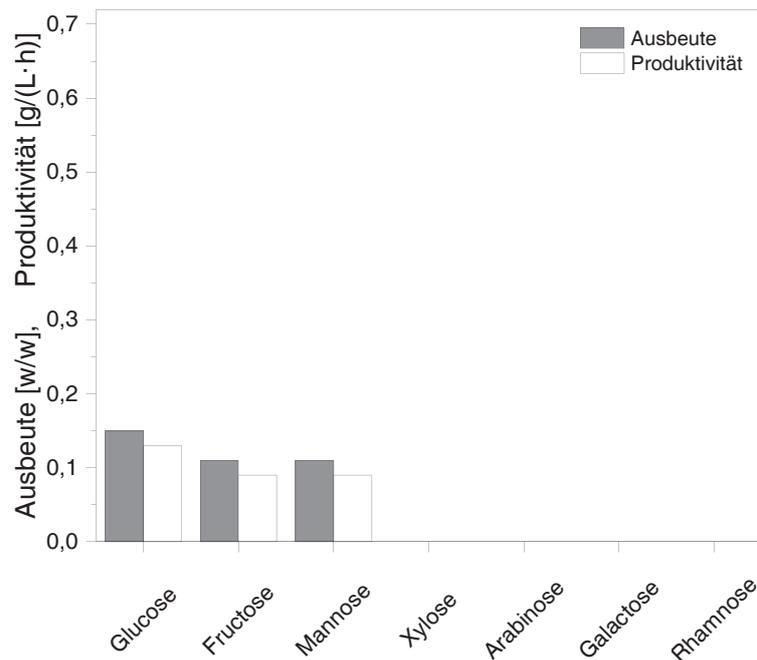


Abbildung 4.4 – Vergleich von Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von *U. maydis* auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO₃.

mit Xylose notwendig. In dieser Arbeit wurde die Hefe zuvor auf einem Medium mit Saccharose angezogen, welche aus den Monomeren Glucose und Fructose besteht. Darin könnte der Grund liegen, warum Glucose und Fructose gut für die Itaconsäurebildung genutzt werden konnten. Mannose zeigt einen ähnlichen Stoffwechselweg wie Fructose auf. Der Zucker wird mit einer Hexokinase (2.7.1.1) zu Mannose-6-phosphat phosphoryliert, anschließend zu Fructose-6-phosphat umgewandelt (Mannose-6-phosphat Isomerase 5.3.1.8) und gelangt so in die Glycolyse. Aufgrund des ähnlichen Stoffwechselweges von Fructose und Mannose könnte somit auch die Verstoffwechslung von Mannose zu Itaconsäure positiv beeinflusst worden sein. Basierend auf den Erkenntnissen von Maassen et al. (2014) wurde für Xylose die Kohlenstoffquelle in der Vorkultur ausgetauscht und der Produktionstest auf Xylose wiederholt. Der Austausch der Kohlenstoffquelle führte zu keiner Verbesserung der Itaconsäureproduktion auf Xylose, es wurde lediglich eine Konzentration < 0,1 g/L nach 4 Tagen im Medium nachgewiesen.

4.1.2.2 Zuckerverwertung *U. rabenhorstiana*

U. rabenhorstiana zeigte nach 4 Tagen Wachstum auf Glucose, Fructose, Mannose, Xylose und Arabinose bei 30 °C in Reagenzgläsern. Das Wachstum auf

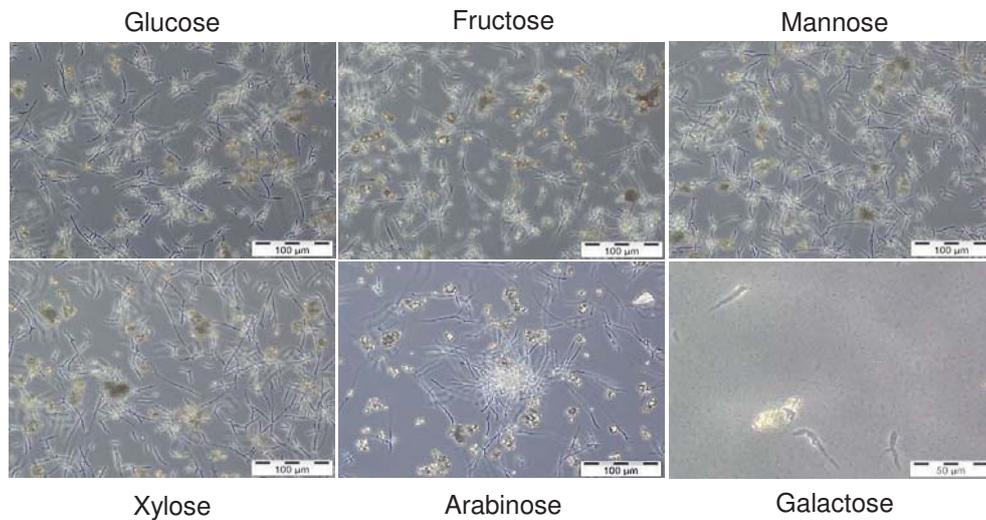


Abbildung 4.5 – Übersicht der Morphologie von *U. rabenhorstiana* auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO₃, 200-fach vergrößert, Galactose 400-fach vergrößert.

Galactose war deutlich eingeschränkt und auf Rhamnose konnte kein Wachstum festgestellt werden (s. Abbildung 4.5). Es zeigten sich Lipideinschlüsse bei der Kultivierung mit Glucose. 90 % der enthaltenen Fettsäuren waren C16:0, C18:0 und C18:2n6trans. Die genaue Zusammensetzung der Fettsäuren der Zellen kann dem Anhang entnommen werden (s. Anhang B.2, S. 163). Die Morphologie auf den einzelnen Monosacchariden war sehr ähnlich. Die zigarrenförmigen Einzelzellen aus der Vorkultur mit Saccharose veränderten sich auf allen Substraten zu verzweigten Pseudohyphen oder Hyphen. Auf Arabinose zeigten sich zudem große Ansammlungen von verschlungenen Hyphen, wie eine Art Pellet. Das Wachstum auf Galactose war sehr gering, somit waren noch einzelne haploide Zellen zu erkennen.

Trotz einer ähnlichen Morphologie waren Ausbeuten und Produktivitäten auf den einzelnen Zuckermonomeren sehr unterschiedlich (s. Abbildung 4.6). Für die Referenz mit Glucose zeigte sich eine Produktivität von 0,16 g/(L·h) Itaconsäure und eine Ausbeute von 0,24 (w/w). Eine ähnliche Ausbeute von 0,22 (w/w) wurde mit Mannose erzielt, wobei die Produktivität mit 0,09 g/(L·h) um 44 % reduziert war. Die Produktivität von Itaconsäure auf Fructose entsprach der Produktivität auf Mannose, jedoch war die Ausbeute mit 0,17 (w/w) geringer. Auch konnte *U. rabenhorstiana* beide Pentosen zum Wachstum und Itaconsäureproduktion

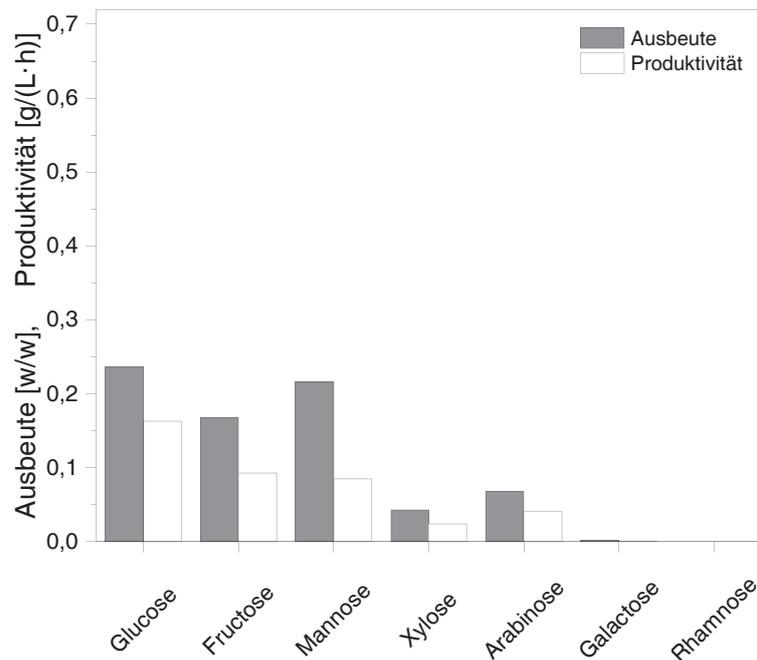


Abbildung 4.6 – Vergleich von Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von *U. rabenhorstiana* auf unterschiedlichen Zuckermonomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in Reagenzgläsern, 120 rpm, 30 °C, Start-pH 6,7, Pufferung durch 30 g/L CaCO₃.

nutzen. Dabei wurde mit Arabinose eine leicht höhere Ausbeute und Produktivität erzielt, als mit Xylose. Die Produktivität auf beiden Monosacchariden von 0,02 g/(L·h) für Xylose und 0,04 g/(L·h) für Arabinose lagen in einem ähnlichen Bereich und deutlich unter der Produktivität des Referenzzuckers. Ein geringer Teil der Galactose konnte von *U. rabenhorstiana* zum Wachstum genutzt werden, zudem konnten Spuren von Itaconsäure nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte Rhamnose weder für die Itaconsäureproduktion, noch zur Bildung von Biomasse genutzt werden. Bei allen Kultivierungen sank der anfängliche pH-Wert von pH 6,7 auf pH 5,4–5,7 ab.

Insgesamt betrachtet konnte *U. rabenhorstiana* neben Glucose auch Fructose, Mannose, Xylose, Arabinose und Galactose zur Biomasse und Itaconsäurebildung nutzen. Guevarra and Tabuchi (1990) beschrieben die Bildung von Itaconsäure mit *U. rabenhorstiana* nur auf Glucose, weitere Untersuchungen zur Nutzbarkeit unterschiedlicher Substrate sind nicht bekannt. Da es sich bei *U. rabenhorstiana* um einen Brandpilz der Fingerhirse und Hirse handelt (Kühn, 1876), ist davon auszugehen, dass dieser Organismus Enzymsysteme besitzt, um auf lignocellulosehaltiger Biomasse zu wachsen und die enthaltenen Zucker verwerten kann.

4.1.2.3 Zuckerverwertung *A. terreus*

Nach vier Tagen Kultivierung von *A. terreus* in Mikrotiterplatten mit 0,1 g/L KH_2PO_4 und 33 °C zeigte sich, dass auf sechs von sieben Substraten die Sporen ausgekeimt waren (Abbildung 4.7). So konnte der Pilz auf Glucose, Fructose, Mannose, Mannose, Xylose, Arabinose und Galactose wachsen. Jedoch hatten sich abhängig vom Substrat unterschiedliche Wachstumsformen gebildet. Mit Glucose zeigten sich gleichmäßig große Pellets mit Mycelfäden. Eine ähnliche Pelletform konnte auch auf Fructose festgestellt werden. Dabei waren die Pellets augenscheinlich deutlich kompakter. Mit Mannose bildete sich im Gegensatz dazu ein loses, dichtes Mycelgeflecht aus. Bei der Kultivierung mit Xylose konnte kein typisches Pelletwachstum oder ein großflächiges Hyphengeflecht festgestellt werden. Hier zeigten sich kleine kompakte, unregelmäßige Formen mit vereinzelt langen Hyphenausläufern. *A. terreus* bildete auf Arabinose kleine Pellets mit sehr dünnen und langen Hyphenfäden. Mit Galactose keimten, im Gegensatz zu Rhamnose, zwar die Sporen aus, jedoch bildeten sich weder Pellets noch ein Hyphengeflecht aus.

Wie beschrieben konnte auf sechs Monosacchariden Wachstum nachgewiesen werden, die Itaconsäurebildung war jedoch nur auf Glucose, Fructose, Mannose, Xylose und Arabinose möglich. In Abbildung 4.7 wird deutlich, dass es bei Ausbeute und Produktivität auf den einzelnen Monosacchariden Unterschiede gab. Im

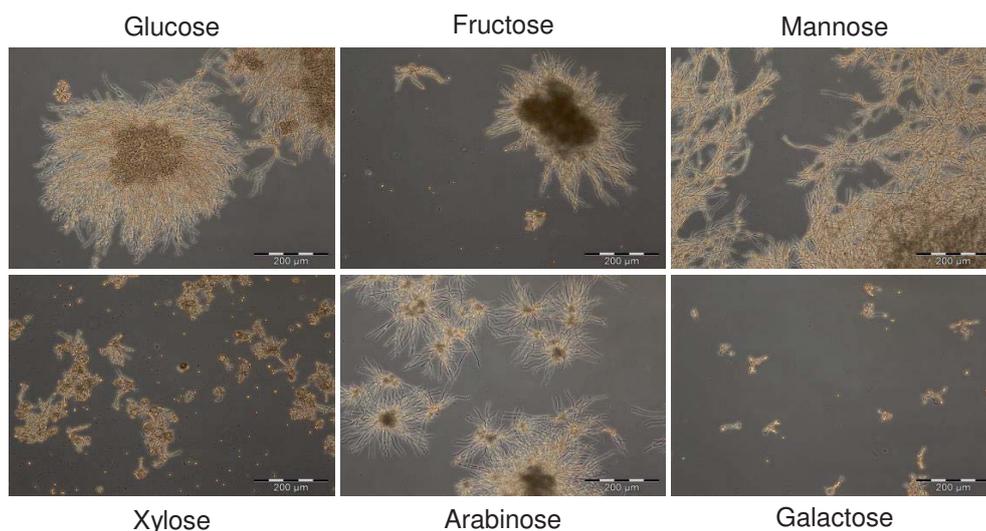


Abbildung 4.7 – Übersicht der Morphologie von *A. terreus* auf unterschiedlichen Zuckermomeren als Substratquelle nach 4 Tagen in einer 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 33 °C, Start-pH 3,1, ungerregelt, 100-fach vergrößert.

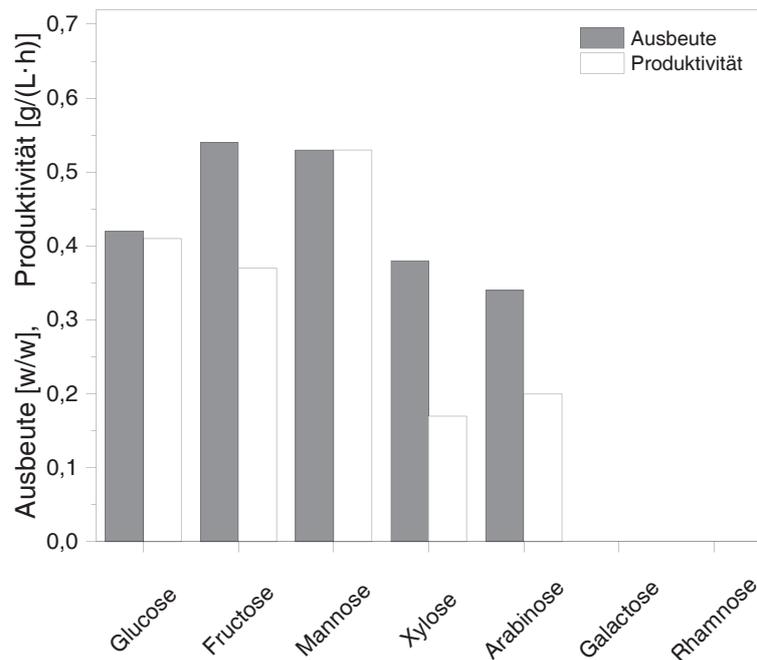


Abbildung 4.8 – Vergleich der Itaconsäureproduktivität und Ausbeute von *A. terreus* nach 4 Tagen auf unterschiedlichen Zuckermolekülen als Substratquelle nach 4 Tagen in einer 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 33 °C, Start-pH 3,1, unregelt.

Referenzsystem mit Glucose konnte 39,2 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,42 (w/w) und einer Produktivität von 0,41 g/(L·h) gebildet werden. Mit Fructose konnte in etwa eine ähnliche Produktivität von 0,37 g/(L·h) erzielt werden, jedoch war die Ausbeute um 28 % im Vergleich zur Referenz erhöht. Mit Mannose wurde der höchste Titer erzielt, was einer Produktivität von 0,53 g/(L·h) entsprach und einer Ausbeute von 0,53 (w/w). Im Vergleich mit Glucose war die Produktivität um 29 % erhöht. Bei beiden Pentosen reduzierte sich die Produktivität um etwa die Hälfte auf 0,2 g/(L·h) mit Arabinose und 0,18 g/(L·h) mit Xylose. Die Ausbeuten lagen bei 0,38 (w/w) und 0,34 (w/w).

Dieses breite Substratspektrum deckt sich mit Erkenntnissen von Eimhjellen and Larsen (1955), die bereits für *A. terreus* NRRL 1960 Wachstum und Bildung von Itaconsäure mit unterschiedlichen Zuckern und Zuckeralkoholen beschrieben. Auch Saha et al. (2017) zeigte, dass unterschiedlichste *A. terreus* Stämme neben Glucose auch Xylose und Arabinose für die Itaconsäurebildung nutzen. Auf allen Zuckern, die in dieser Arbeit getestet wurden, beschrieben Eimhjellen and Larsen (1955) ein Wachstum, ebenso auf Rhamnose. In dieser Arbeit wurde keine Itaconsäure mit Rhamnose gebildet. Zudem beschrieben Eimhjellen and Larsen (1955) eine Itaconsäureausbeute auf Galactose von 0,04 (w/w). Vermutlich sind

diese Abweichungen im Vergleich zu dieser Arbeit darauf zurückzuführen, dass Eimhjellen and Larsen (1955) die Sporen zuvor auf Glucose auskeimen ließen und anschließend das Mycel auf das jeweilige Substrat überführten. In dieser Arbeit wurden die einzelnen Substrate direkt mit Sporen inokuliert.

Die Bildung von Itaconsäure aus Xylose ist nach Glucose, im Vergleich zu den anderen getesteten Zuckermonomeren, am ausführlichsten in der Literatur beschrieben (Kautola et al., 1985; Kautola, 1990; Kuenz, 2008). Dabei wird beschrieben, dass die Bildung von Itaconsäure auf Xylose im Vergleich zu Glucose deutlich langsamer ist. Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, die Produktivität war auf Xylose um 59 % reduziert gegenüber der Produktivität auf Glucose.

4.1.2.4 Zuckerverwertung - Vergleich

Für den Vergleich ob und wie effektiv Zuckermonomere aus lignocellulosehaltiger Biomasse für die Bildung von Biomasse und Itaconsäure durch die einzelnen Mikroorganismen genutzt werden können, wurde die Produktivität auf den einzelnen Zuckern mit einer Referenzkultivierung des jeweiligen Organismus auf Glucose verglichen (s. Tabelle 4.2). Es wird deutlich, dass *A. terreus* und *U. rabenhorstiana* ein ähnliches Substratspektrum aufweisen. Beide Mikroorganismen sind in der Lage auf Glucose, Fructose, Mannose, Xylose und Arabinose Itaconsäure zu produzieren. Darüber hinaus konnten mit *U. rabenhorstiana* geringe Konzentrationen an Itaconsäure auf Galactose festgestellt werden. Im Vergleich zu diesen beiden Organismen war *U. maydis* nicht in der Lage, Xylose und Arabinose für die

Tabelle 4.2 – Vergleich der Zuckerverwertung von *A. terreus*, *U. rabenhorstiana* und *U. maydis* nach 4 Tagen bezogen auf die Itaconsäureproduktivität mit Glucose. > 75 % +++++; 75–50 % ++++; 50–25 % +++; < 25 % ++; keine Itaconsäurebildung -

Zucker	<i>A. terreus</i>	<i>U. rabenhorstiana</i>	<i>U. maydis</i>
Glucose	+++++	+++++	+++++
Fructose	+++	+++	+++
Mannose	+++++	+++	+++
Xylose	++	+	-
Arabinose	++	++	-
Galactose	-	+	-
Rhamnose	-	-	-

Itaconsäureproduktion zu nutzen, es wurde lediglich Biomasse gebildet. Keiner der ausgewählten Mikroorganismen konnte Rhamnose verstoffwechseln. Jedoch macht dieses Zuckermonomer im Fall von Weizenkaff, das in dieser Arbeit verwendet werden soll, den geringsten Anteil mit ca. 2 % der vorhandenen Zuckermomere aus (s. Kapitel 4.2.1, S. 81). Im Hinblick auf die Nutzung alternativer Zucker auf Basis von lignocellulosehaltiger Biomasse für die Itaconsäureproduktion sind *A. terreus* und *U. rabenhorstiana* aufgrund der Zuckerverwertung geeigneter als *U. maydis*.

4.1.3 Einfluss von typischen Nebenprodukten aus der Lignocellulose-Vorbehandlung auf die Itaconsäureproduktion

Neben Zuckern können im Hydrolysat schwache Säuren, Furanaldehyde oder phenolische Bestandteile enthalten sein, die eine inhibierende Wirkung auf Wachstum und Produktion von Itaconsäure haben können (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Jönsson et al., 2013; van der Pol et al., 2014). Die Biomasse selbst und die Art der Vorbehandlung der Biomasse sind entscheidend dafür, welche möglichen Inhibitoren entstehen können.

Um den jeweiligen Einfluss der einzelnen Nebenprodukte der Biomassevorbehandlung abschätzen zu können, wurde einer Standardkultivierung mit Glucose durchgeführt und mit typischen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren versetzt. Als Beispiel für schwache Säuren wurden der Einfluss von Ameisen-, Essig- und Lävulinsäure auf die Itaconsäureproduktivität untersucht und als mögliche auftretende Furanaldehyde wurden HMF und Furfural getestet.

4.1.3.1 Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf *U. maydis*

Mit *U. maydis* wurden die Inhibierungsversuche in schrägen Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt. Dabei wurde Tabuchi-Medium mit einem Start-pH-Wert von pH 6,7 verwendet und die Ansätze 4 Tage kultiviert. Die erzielten Produktivitäten von Itaconsäure in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

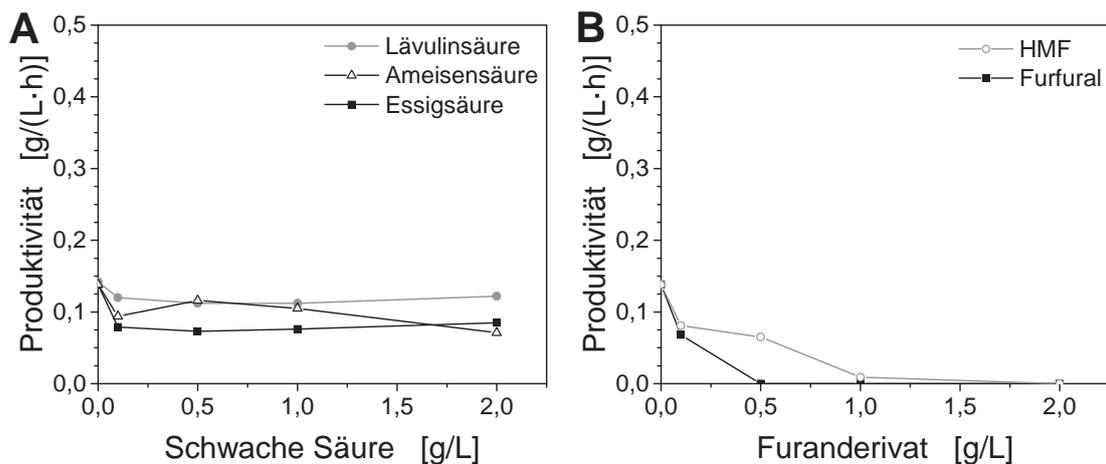


Abbildung 4.9 – Einfluss von schwachen Säuren (A) und Furanderivaten (B) auf die Produktivität von Itaconsäure mit *U. maydis* in Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 6,7 nach 4 Tagen.

Ohne Zusatz eines Inhibitors wurde eine Itaconsäureproduktivität von 0,14 g/(L·h) festgestellt. Durch die Zugabe von 0,1–2 g/L Lävulinsäure sank die Produktivität auf durchschnittlich 0,11 g/(L·h) leicht ab. Die Produktivität wurde durch Ameisensäure im Konzentrationsbereich von 0,1–1 g/L im Mittel um 25 % auf 0,1 g/(L·h) gesenkt. Eine weitere Erhöhung auf 2 g/L zeigte den stärksten Einfluss und nur noch eine Produktivität von 0,07 g/(L·h). Im gesamten getesteten Konzentrationsbereich beeinflusste die Essigsäure die Produktivität unabhängig von der eingesetzten Inhibitorkonzentration. So sank die Produktivität auf ca. 0,08 g/(L·h) ab. *U. maydis* wuchs unter dem Zusatz der schwachen Säuren in zigarrenförmigen Einzelzellen mit deutlichen Einschlüssen von Lipiden.

Im Vergleich zu den schwachen Säuren zeigten die Furanderivate einen stärkeren Einfluss auf die Produktivität. Konzentrationen von 0,1 g/L HMF oder 0,1 g/L Furfural ließen die Produktivität von 0,14 g/(L·h) auf 0,07 g/(L·h) mit dem Inhibitor Furfural und 0,08 g/(L·h) für HMF sinken. Eine Erhöhung der Furfuralkonzentration im Medium führte dazu, dass das Wachstum inhibiert wurde. Für HMF zeigte sich ein anderes Bild. Ab einer Konzentration von 1 g/L im Medium konnte noch Wachstum von *U. maydis* festgestellt werden, jedoch stellte der Organismus die Produktion von Itaconsäure ein. Es hatten sich unabhängig der Furfural- oder HMF-Konzentration zigarrenförmige Einzelzellen gebildet.

Der pH-Wert aller Kultivierungen war von pH 6,7 in einen Bereich von pH 5,8–6,4 gefallen. Aus diesem Grund lagen die schwachen Säuren größtenteils als Anion im Medium vor und durchschnittlich nur 8 % Essigsäure, 6 % Lävulinsäure

und 1 % Ameisensäure. Vermutlich war daher der Einfluss aller Säuren auf die Itaconsäurebildung mit *U. maydis* gering. *U. maydis* konnte wahrscheinlich das Einströmen der schwachen Säuren kompensieren, da ausreichend ATP zur Verfügung stand und die Produktivität unabhängig der Säurekonzentration im Medium konstant blieb. Die geringe Abnahme der Produktivität kann daher mit dem zusätzlich benötigten ATP und der Anreicherung der Anionen in der Zelle begründet werden (Russell, 1992).

Bei *Saccharomyces cerevisiae* wirken HMF und Furfural als Hemmstoffe auf unterschiedliche Enzyme in der Glykolyse und für die Pyruvatdehydrogenase (Banerjee et al., 1981; Modig et al., 2002). Dabei beschreibt Modig et al. (2002), dass der Effekt von Furfural auf den Mikroorganismus stärker ist als HMF. Dieses Bild zeigte sich auch bei *U. maydis*.

4.1.3.2 Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf *U. rabe-nhorstiana*

Die Inhibierungsversuche mit *U. rabe-nhorstiana* wurden bei 30 °C in schräg geschüttelten Reagenzgläsern durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Produktivität von 0,15 g/(L·h) Itaconsäure im Referenzsystem mit Tabuchi-Medium ohne einen Zusatz von Inhibitoren (s. Abbildung 4.10).

Durch die Zugabe von bis zu 0,5 g/L Ameisensäure veränderte sich die Produktivität nicht. Mit 1 g/L erhöhte sich die Produktivität auf 0,21 g/(L·h) und fiel bei

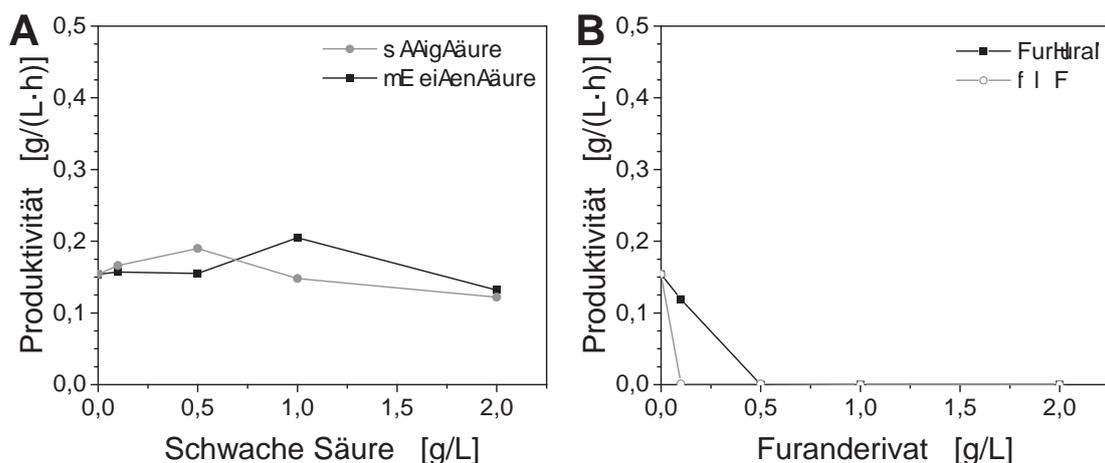


Abbildung 4.10 – Einfluss von schwachen Säuren (A) und Furanderivaten (B) auf die Produktivität von Itaconsäure mit *U. rabe-nhorstiana* in Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 6,7 nach 4 Tagen.

einer Zugabe von 2 g/L Ameisensäure auf 0,13 g/(L·h) ab. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Zugabe von Essigsäure. Die ursprüngliche Produktivität stieg auf 0,19 g/(L·h) durch den Zusatz von 0,5 g/L Essigsäure an und fiel durch die Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 0,12 g/(L·h) ab.

Die beiden Furanderivate beeinflussten *U. rabenhorstiana* sehr stark. Bereits eine Konzentration von 0,1 g/L HMF inhibierte das Wachstum des Organismus. Furfural wirkte wachstumsinhibierend ab einer Konzentration von 0,5 g/L. Die Hefe wuchs in langen unregelmäßigen, verzweigten Hyphen vergleichbar mit dem Wachstum auf Glucose in Abbildung 4.6 (S. 54). Der pH-Wert des Mediums fiel von pH 6,7 auf pH 5,5–5,9 ab.

Aufgrund des pH-Wertes liegen die Säuren hauptsächlich in der dissoziierten Form vor und diffundieren nicht in das Cytoplasma. Im Gegensatz zu *U. maydis* beeinflusst die Zugabe der schwachen Säuren die Produktion von Itaconsäure nicht. Die Produktivität wird sogar gesteigert. Dieser positive Effekt ist bereits in der Literatur bekannt und wird von Maiorella et al. (1983) und Larsson et al. (1999) für die Ethanolproduktion mit *S. cerevisiae*, sowie die Cellulaseproduktion von *T. reesei* (Szengyel and Zacchi, 2000) beschrieben. Dagegen hemmen bereits schon geringe Konzentrationen der Furanderivate wichtige Enzyme des Metabolismus von *U. rabenhorstiana*, sodass es zu einer Wachstumsinhibierung kommt. Modig et al. (2002) beschreibt die stärkste Hemmung der Pyruvatdehydrogenase durch die Furanderivate und damit die Beeinflussung des Zellwachstums.

4.1.3.3 Einfluss von Nebenprodukten der Vorbehandlung auf *A. terreus*

Die Inhibierungsversuche wurden bei 33 °C in Mikrotiterplatten in Standardmedium mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 durchgeführt.

Die Produktivitäten bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Referenz ohne Inhibitor zeigte eine Produktivität von 0,32 g/(L·h) Itaconsäure nach 3,8 Tagen und es hatten sich gleichmäßige lockere Pellets gebildet (s. Abbildung 4.12, S. 63). Durch die Zugabe von 0,1 g/L Ameisensäure wurde die Produktivität leicht gesenkt auf 0,29 g/(L·h), dabei zeigten sich Pellets, mit langen und dichten Mycelausläufern und einem kompakten Inneren. Höhere Ameisensäurekonzentrationen im Medium inhibierten das Auskeimen der Sporen, somit wurde keine Itaconsäure gebildet.

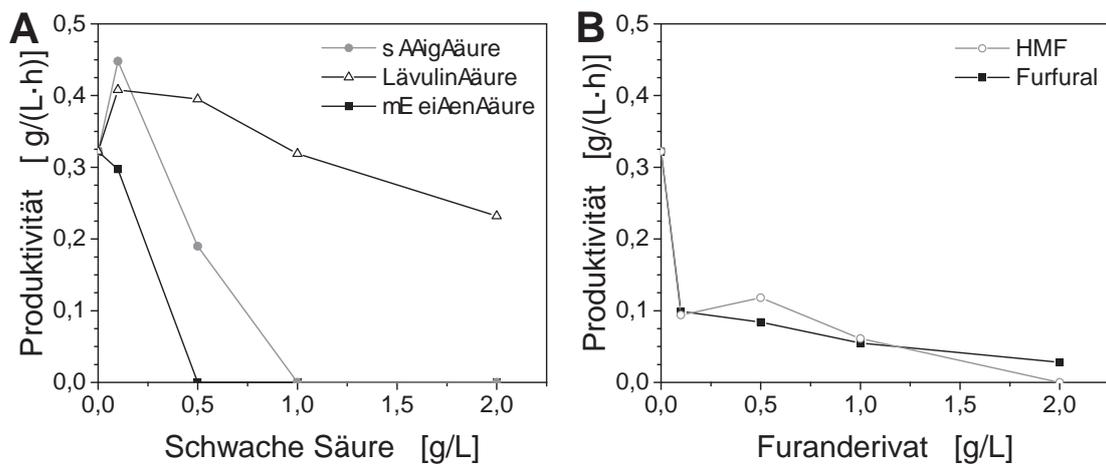


Abbildung 4.11 – Einfluss von schwachen Säuren (A) und Furanderivaten (B) auf die Produktivität von Itaconsäure mit *A. terreus* in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen.

Eine erhöhte Produktivität von 0,45 g/(L·h) wurde durch die Zugabe von 0,1 g/L Essigsäure erzielt, dabei wuchs *A. terreus* in kleineren Pellets, die im Vergleich zur Referenz lockerer erschienen. Eine Erhöhung der Essigsäurekonzentration auf 0,5 g/L resultierte in einer Abnahme der Produktivität um etwa die Hälfte und in sehr kompakten Pellets mit dichten Mycelausläufern. Für Essigsäurekonzentrationen > 1 g/L konnte weder eine Itaconsäurebildung noch ein Wachstum des Pilzes festgestellt werden.

Durch die Zugabe von 0,1 g/L und 0,5 g/L Lävulinsäure wurde die Produktivität auf etwa 0,4 g/(L·h) gesteigert. *A. terreus* wuchs im Vergleich zur Referenz in kleineren lockeren Pellets. Die Zugabe von 1 g/L Lävulinsäure zeigte die gleiche Produktivität wie die Referenz mit 0,32 g/(L·h), dabei waren die Pellets kleiner, kompakter und die Mycelausläufer länger. Mit 2 g/L Lävulinsäure im Medium bildeten sich kompakte Pellets ohne Mycelfäden, deren Produktivität um 26 % gegenüber der Referenz gesunken war.

Insgesamt betrachtet führt der sehr niedrige Start-pH von pH 3,1 und das weitere Absinken während der Kultivierung auf pH 1,8–2 dazu, dass die schwachen Säuren hauptsächlich als undissoziierte Säuren vorlagen. Diese Form ist fettlöslich und kann durch die Plasmamembran in das Cytosol diffundieren. Auf Basis des fast neutralen pH-Wertes innerhalb der Zelle dissoziiert die Säure im Cytosol in Säureanion und Proton (Lambert and Stratford, 1999; Axe and Bailey, 1995; Pampulha and Loureiro-Dias, 1989; Plumridge et al., 2004). Um den Anstieg des intrazellulären pH-Werts zu verhindern, werden die Protonen aktiv mittels der

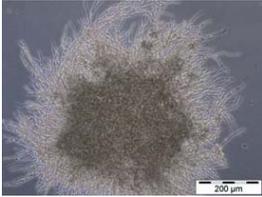
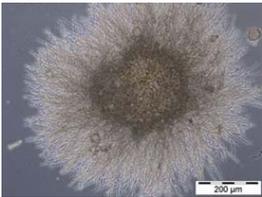
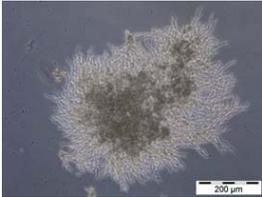
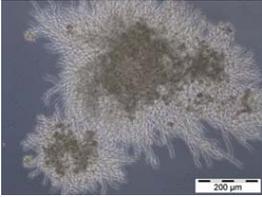
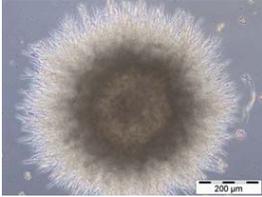
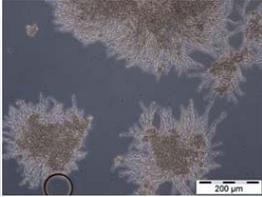
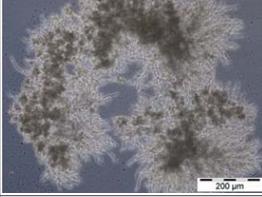
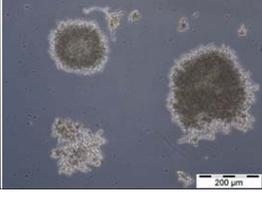
	Ameisensäure	Essigsäure	Lävulinsäure
0 g/L			
0,1 g/L			
0,5 g/L	k. W.		
1 g/L	k. W.	k. W.	
2 g/L	k. W.	k. W.	

Abbildung 4.12 – Einfluss von schwachen Säuren auf die Morphologie und das Wachstum von *A. terreus* in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen, 100-fach vergrößert, k. W. kein Wachstum.

Plasmamembran-ATPasen aus der Zelle gepumpt und benötigen für den Ausgleich des erhöhten ATP-Verbrauchs mehr Sauerstoff (Hesse et al., 2002). Aus diesem Grund könnte das Wachstum und somit die Itaconsäureproduktion von *A. terreus* inhibiert worden sein. Der unterschiedlich starke Einfluss der drei Säuren könnte damit erklärt werden, dass nicht nur mehr Energie für das Ausschleusen des Protons benötigt wurde, sondern nach Russell (1992) auch die Anreicherung des Säureanions innerhalb des Organismus der Grund für eine Inhibierung sein könnte.

Die Anwesenheit der Furanderivate HMF und Furfural im Medium führten zu einem ähnlichen Einbruch der Produktivität, wie die Anwesenheit der Säuren. Die Produktivität fiel von 0,32 g/(L·h) durch 0,1 g/L des jeweiligen Furanderivates

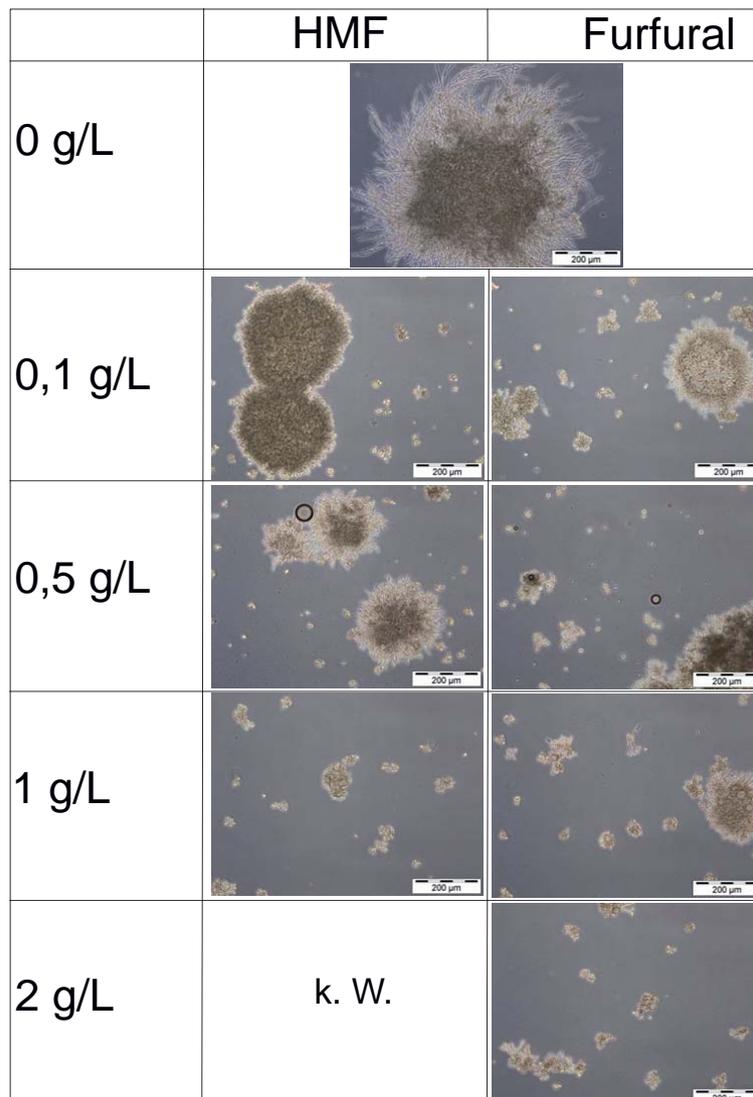


Abbildung 4.13 – Einfluss von Furanderivaten auf die Morphologie und das Wachstum von *A. terreus* in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem Start-pH-Wert von pH 3,1 nach 4 Tagen, 100-fach vergrößert, k. W. kein Wachstum.

auf etwa 0,1 g/(L·h) ab. Die gleichmäßig geformten, lockeren Pellets wurden kompakter, es zeigten sich nur noch sehr kurze Mycelfäden (s. Abbildung 4.13). Mit zunehmender Konzentration an Furfural und HMF sank die Produktivität weiter und der Pelletdurchmesser nahm ab. In Anwesenheit von 2 g/L Furfural konnte nur noch eine Produktivität von 0,06 g/(L·h) erzielt werden. Bei der gleichen HMF-Konzentration von 2 g/L keimten die Sporen nicht mehr aus.

Banerjee et al. (1981) beschreibt für den Hefemetabolismus, dass Furfural die Aktivität von unterschiedlichen Enzymen in der Glycolyse, wie die Hexokinase oder die Phosphorfructokinase, hemmt. Besonders großen Einfluss können Furfural

und HMF auf die Pyruvatdehydrogenase haben (Modig et al., 2002), sodass die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Furanderivate gehemmt wird. Es wird somit deutlich weniger Acetyl-CoA gebildet, das in den Citratzyklus gelangen kann. Daher sind die Energiegewinnung der Zelle und die Synthese wichtiger Zellmetabolite aus dem Citratzyklus negativ beeinflusst. Im Fall von *A. terreus* könnte so auch das Wachstum und die Itaconsäurebildung gehemmt sein.

Zusätzlich wurde auch der Einfluss unterschiedlicher phenolischer Nebenprodukte auf *A. terreus* getestet. Die Konzentration und Zusammensetzung der Cumaryl-, Guajacyl- und Sinapyl-Elemente des Lignins basieren auf der Biomasse selbst und der eingesetzten Vorbehandlung (Du et al., 2010; Zeng et al., 2013). Dabei sind die auftretenden Konzentrationen deutlich geringer als die von Säuren oder Furanderivaten (van der Pol et al., 2014). Typischerweise kann bei der Vorbehandlung von Weizenstroh Syringaldehyd, Vanillin, p-Hydroxybenzaldehyd, Gallussäure oder Ferulasäure entstehen (Lawther et al., 1996). Basierend auf Jurchescu (2014) wurde in dieser Arbeit Vanillin sowie Syringaldehyd bis zu einer Konzentration von 60 mg/L untersucht und 4-Hydroxybenzoesäure bis zu einer Konzentration von 300 mg/L.

Die untersuchten potenziellen phenolischen Nebenprodukte zeigten einen geringen Einfluss auf die Itaconsäurebildung, die Morphologie war unverändert. Durch die Zugabe von Vanillin nahm die Produktivität stetig ab. Bei der maximal untersuchten Konzentration von 60 mg/L wurde eine um 24 % reduzierte Konzentration an Itaconsäure nachgewiesen. Auch die Inhibierung durch 60 mg/L Syringaldehyd lag mit 19 % im gleichen Bereich. Lediglich 4-Hydroxybenzoesäure zeigte keinen Einfluss auf die Produktion.

Die Wirkung von Phenolen auf Mikroorganismen sind aufgrund der vielseitigen Struktur, wie Unterschiede im Molekulargewicht oder Anzahl, Position und Struktur der Seitengruppen, vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt (Almeida et al., 2007; Jönsson et al., 2013; van der Pol et al., 2014). Neben der Inhibierung von Enzymen im Organismus können sich Phenole im Medium auch auf die Translation und somit auf die Zusammensetzung der Mitochondrienmembran auswirken (Keweloh et al., 1990; Iwaki et al., 2013; Zhang et al., 2012).

4.1.3.4 Einflüsse von Nebenprodukten der Vorbehandlung - Vergleich

Durch die Zugabe der Zuckerabbauprodukte zum Produktionsmedium zeigte sich, dass sich die Itaconsäureproduktion mit den Hefen von dem filamentösen

Pilz deutlich unterscheidet. In Abbildung 4.14 ist der Einfluss von Ameisensäure beispielhaft für die schwachen Säuren und der Einfluss von Furfural für die Furanderivate auf die Produktivität dargestellt. Hierfür wurde die Produktivität normiert, um die Organismen untereinander vergleichen zu können.

Beim Zusatz von schwachen Säuren liegt aufgrund des niedrigen Start-pH-Wertes von pH 3,1 bei der Kultivierung von *A. terreus* hauptsächlich die undissoziierte Form der Säure im Medium vor. Diese Form kann in das Cytoplasma diffundieren und den intrazellulären pH-Wert absenken. Aus diesem Grund reichen geringe Konzentrationen von schwachen Säuren aus, um das Wachstum des Pilzes zu inhibieren (Ameisensäure < 0,1 g/L). Der pH-Wert der Kultivierung mit *U. maydis* und *U. rabehorstiana* liegt deutlich höher. Bei einem anfänglichen pH-Wert von pH 6,7 liegt hauptsächlich die dissoziierte Säureform vor, welche nicht durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Aus diesem Grund werden beide Hefen im Vergleich zu *A. terreus* durch dieses Zuckerabbauprodukt weniger negativ beeinflusst. Trotz 2 g/L Ameisensäure wurde eine Produktivität von etwa 51 % für *U. maydis* und 86 % für *U. rabehorstiana* von der ursprünglichen Produktivität erzielt. Im Gegensatz dazu wirkte Furfural toxisch auf die Hefezellen bei Konzentrationen > 0,1 g/L. *A. terreus* zeigt bei den getesteten Konzentrationen noch die Produktion von Itaconsäure, jedoch war diese bis zu 90 % reduziert im Vergleich zur Kultivierung ohne Zusatz von Furfural.

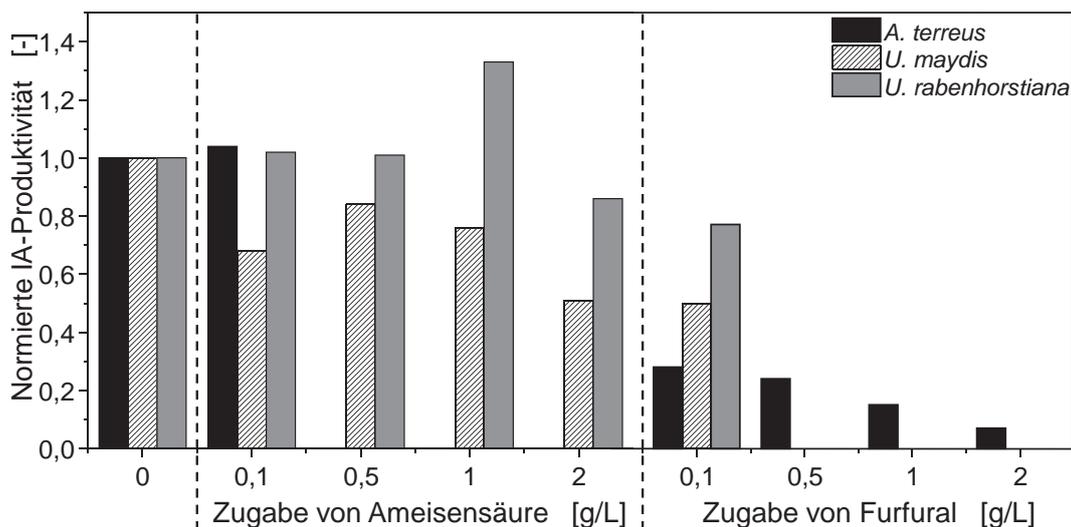


Abbildung 4.14 – Vergleich des Einflusses auf die Itaconsäureproduktivität durch Zugabe von Ameisensäure oder Furfural von *A. terreus*, *U. maydis* und *U. rabehorstiana*. Normiert auf die Produktivität ohne Zusatz von Inhibitoren.

Somit lässt sich insgesamt sagen, dass die Hefen aufgrund des pH-Wertes während der Kultivierung deutlich robuster gegenüber den schwachen Säuren sind. Auch Larsson et al. (1999) sieht den Effekt der schwachen Säuren im herrschenden pH-Wert während der Kultivierung, je niedriger der pH-Wert, desto stärker der Einfluss der Säuren auf den Mikroorganismus. Im Gegensatz dazu hält *A. terreus* höhere Konzentrationen an Furanderivaten aus, die wichtige Enzyme im Stoffwechsel inhibieren. Bei der Nutzung von Hydrolysaten sollte daher grundsätzlich beachtet werden, dass unabhängig vom genutzten Mikroorganismus, Hydrolysate mit einer sehr geringen Zuckerabbaukonzentration eingesetzt werden müssen, um ausreichende Produktivitäten erzielen zu können. Zudem wurde nur die Wirkung einzelner Abbauprodukte getestet, in Kombination würde sich vermutlich der Inhibierungseffekt verstärken. Taherzadeh et al. (2000) und Palmqvist et al. (1999) beschreiben, dass Synergieeffekte zwischen Furfural und HMF, sowie Essigsäure und Furfural auftreten können. Dies lässt bei einer Kombination der Zuckerabbauprodukte im Hydrolysat vermuten, dass einerseits die Produktivität weiter absinken oder es zu einer Inhibierung des Wachstums der Mikroorganismen kommen könnte.

4.1.4 Einfluss der Enzymformulierung

Für einen SHF oder SSF werden Enzymmischungen zur Hydrolyse hinzugefügt. Die eingesetzte Enzymmischung Biogazyme 2x enthielt neben Proteinen weitere Elemente aus der Formulierung, die mittels ICP-OES analysiert wurden. Die Proteinmischung enthielt neben Cellulasen, Xylanasen und β -Glycosidasen größere Mengen an Kalium, Natrium und Phosphor. Des Weiteren wurden Eisen, Magnesium, Mangan und in Spuren Aluminium, Bor, Kupfer, Nickel, Strontium und Zink festgestellt. Die genauen Konzentrationen der Enzymformulierung sind Tabelle 4.3 zu entnehmen. Für die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* ist bekannt, dass Ionen wie Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} das Wachstum und somit auch die Produktivität von Itaconsäure stark beeinflussen können (Lockwood and Reeves, 1946; Batti and Schweiger, 1963; Gyamerah, 1995a; Welter, 2000; Kuenz et al., 2012; Karaffa et al., 2015). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Enzymformulierung auf die Itaconsäureproduktivität aller drei Mikroorganismen im kleinen Maßstab untersucht, indem unterschiedliche Konzentrationen der Enzymmischung der Kultivierung hinzugefügt wurden.

Tabelle 4.3 – Konzentrationen unterschiedlicher Elemente der Enzymmischung Biogazyme 2x.

Element	Biogazyme 2x [mg/g]
Al	0,0037
B	0,0006
Cu	0,0093
Fe	0,0143
K	9,92
Mg	0,5743
Mn	0,0105
Ni	0,0010
Na	6,13
P	5,87
Sr	0,035
Zn	0,0113

4.1.4.1 Einfluss der Enzymformulierung *U. maydis*

Die Wirkung von Biogazyme 2x auf die Itaconsäureproduktion mit *U. maydis* wurde in schräg geschüttelten Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm getestet (Abbildung 4.15, S. 69). Ohne Zugabe der Enzymmischung wurde eine Produktivität von 0,14 g/(L·h) mit Glucose nach 3,8 Tagen festgestellt. Durch die Zugabe von 3,3 g/L und 4,7 g/L der Enzymmischung veränderte sich die Produktivität von 0,15 g/(L·h) kaum. Bei einer weiteren Erhöhung auf 6,6 g/L stieg die Produktivität auf 0,19 g/(L·h) an und fiel mit 7,5 g/L wieder auf das ursprüngliche Niveau ab. Insgesamt zeigten sich zigarrenförmige Einzelzellen mit Lipideinschlüssen, die Anzahl an sehr langen, schlauchförmigen Zellen ohne Verzweigung nahm mit steigender Biogazyme 2x-Konzentration zu.

U. maydis wird von Klement et al. (2012) als sehr robust beschrieben. Speziell hohe Osmolaritäten verlangsamten zwar das Wachstum, inhibieren den Organismus jedoch nicht. Ein Wachstum war noch mit dem Zusatz von 73,15 g/L Natriumchlorid möglich. Jedoch wies Klement et al. (2012) auch nach, dass hohe Salzkonzentrationen aus Hydrolysaten das Wachstum und somit die Itaconsäureproduktion reduzieren. Der getestete Konzentrationsbereich von 0–9,4 g/L Biogazyme 2x setzte die Produktivität nicht herab, sondern ließ diese teilweise leicht ansteigen.

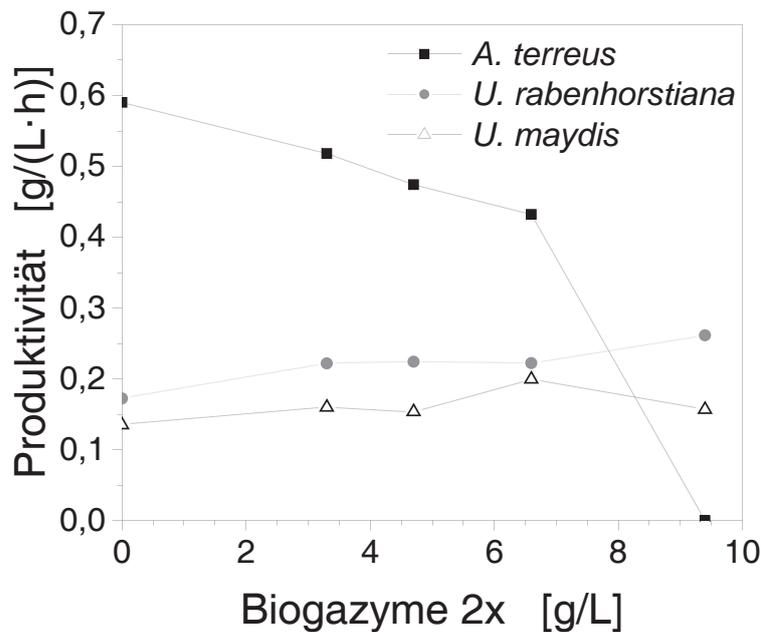


Abbildung 4.15 – Einfluss des Enzympräparates Biogazyme 2x auf die Itaconsäureproduktivität mit *A. terreus* in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm und *U. maydis* sowie *U. rabenhorstiana* in schräg geschüttelten Reagenzgläsern bei 30 °C und 120 rpm nach 3,8 Tagen.

Dieser leichte Anstieg wurde vermutlich durch Ionen/Salze aus der Enzymmischung hervorgerufen, da das verwendete Medium nach Guevarra and Tabuchi (1990) nicht optimiert war. Somit bestätigte die konstante Produktivität trotz zunehmender Konzentration an Ionen im Medium durch die Enzymmischung, dass *U. maydis* im getesteten Konzentrationsbereich robust gegenüber den enthaltenen Ionen ist.

4.1.4.2 Einfluss der Enzymformulierung *U. rabenhorstiana*

U. rabenhorstiana wurde bei 30 °C in schräg geschüttelten Reagenzgläsern bei 120 rpm kultiviert und die Produktivität nach 3,8 Tagen bestimmt (Abbildung 4.15). Es zeigte sich eine Produktivität von 0,17 g/(L·h) im Tabuchi-Medium mit Glucose. Durch die Zugabe von 3,3 g/L Biogazyme 2x erhöhte sich die Produktivität auf 0,22 g/(L·h). Die Produktivität blieb bis zu einer Konzentration von 6,6 g/L der Enzymmischung konstant und stieg bei der Zugabe von 7,5 g/L leicht auf 0,26 g/(L·h) an. Die Hefe zeigte lange verzweigte, teilweise sprossende Zellen, wie eine Art Mycel mit Lipideinschlüssen. Durch den Einsatz von Biogazyme 2x veränderte sich die Morphologie nicht.

Aufgrund der gleichen Zuordnung von *U. rabenhorstiana* und *U. maydis* zur Ordnung der *Ustilaginales* ist davon auszugehen, dass auch *U. rabenhorstiana* sehr robust gegenüber Ionen bzw. Salz im Medium ist. Diese Annahme bestätigte sich, da die Produktivität durch die Zugabe der Enzymmischung positiv beeinflusst wurde. Das Standardmedium nach Guevarra and Tabuchi (1990) enthielt vermutlich nicht die optimale Zusammensetzung für die Itaconsäureproduktion, sodass die Zusammensetzung des Mediums durch die Zugabe der Enzymmischung verbessert wurde.

4.1.4.3 Einfluss der Enzymformulierung auf *A. terreus*

Der Einfluss von Biogazyme 2x wurde in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit Glucose als Substrat untersucht. Die Proben wurden nach 3,8 Tagen entnommen (Abbildung 4.15, S. 69). Die Produktivität sank von 0,59 g/(L·h) durch die Zugabe von 6,6 g/L Biogazyme 2x linear auf 0,43 g/(L·h) ab. *A. terreus* wuchs in ausgefransten gleichmäßigen Pellets, durch die Zugabe der Enzymmischung veränderte sich die Morphologie. Es zeigte sich loses, lockeres Mycel mit 3,3 g/L Biogazyme 2x. Bei einer Konzentration von 6,6 g/L zeigten sich dagegen kompakte und größere Pellets. Für Biogazymekonzentrationen > 6,6 g/L konnte keine Itaconsäure festgestellt werden. Die Sporen keimten in sehr kleinen knolligen Pellets aus.

Die veränderte Morphologie und die daraus resultierende absinkende Produktivität mit zunehmender Konzentration an Biogazyme 2x im Medium ist auf die Ionen aus der Enzymformulierung zurückzuführen. Gyamerah (1995a), Kuenz et al. (2012) und Karaffa et al. (2015) beschreiben, dass sich Ionen im Medium auf die Morphologie des Pilzes auswirken. Dabei können die höchsten Ausbeuten mit ausgefransten lockeren Pellets erzielt werden (Gyamerah, 1995a). Diese Pelletform konnte nur im Medium ohne Enzymzugabe erzielt werden. Durch die Zugabe der Enzymmischung veränderte sich die Morphologie zu einem losen Mycel und anschließend zu kompakten Pellets, die von Gyamerah (1995a) als Wachstumsform mit geringeren Ausbeuten und Produktivitäten beschrieben werden. Speziell Manganionen in Konzentrationen > 3 µg/L Mn^{2+} im Medium senken die Ausbeute und Produktivität, zusätzlich verändert sich die Morphologie, ab einer Konzentration von 250 mg/L Mn^{2+} (Karaffa et al., 2015). Karaffa et al. (2015) beschreibt die Entstehung von langen und glatten Hyphen, die sich zu einem Mycel zusammenschließen. Jedoch konnten so hohe Konzentrationen an Mangan

im Medium mit Biogazyme 2x nicht nachgewiesen werden. Die max. Mangankonzentration lag bei etwa 10 µg/L bei einem Zusatz von 9,4 g/L Enzymmischung, wobei keine Itaconsäure mehr produziert wurde. Karaffa et al. (2015) wies mit der gleichen Konzentration Mn²⁺ im Medium noch eine Produktivität von etwa 80 % der ursprünglichen Produktivität eines manganionenarmen Mediums nach. Somit kann der Abfall der Produktivität im Bereich von 3,3 bis 6,6 g/L Biogazyme 2x ein Effekt der Mn-Ionen sein. Jedoch zeigt die Inhibierung des Wachstums durch die Zugabe von 9,4 g/L Biogazyme, dass es vermutlich die Gesamtheit aller Ionen im Medium ist, die sich negativ auf das Wachstum, die Morphologie und somit auf die Itaconsäureproduktion auswirkt. Somit sollte ein Einsatz von > 6,7 g/L Biogazyme 2x vermieden werden, um noch einen ausreichenden Titer erzielen zu können.

4.1.4.4 Einfluss der Enzymformulierung - Vergleich

Der Einfluss des zugegebenen Enzyms lag nicht im Protein selbst, sondern ist vermutlich auf die Enzymformulierung zurückzuführen. Aus der Literatur war zu erwarten, dass *A. terreus* deutlich empfindlicher auf die Zugabe der Enzymmischung reagiert, als beide *Ustilago*-Stämme (Klement et al., 2012). Diese Vermutung konnte in den Versuchen bestätigt werden.

Die Zugabe des Enzyms beeinflusste *A. terreus*, sodass sich unterschiedliche Morphologien zeigten, die geringere Produktivitäten aufwiesen. Jedoch lag die Produktivität von *A. terreus* bis zu einer Konzentration von 6,6 g/L Biogazyme 2x mindestens doppelt so hoch wie bei beiden *Ustilago*-Stämmen. Eine Konzentration von 9,4 g/L Enzymmischung im Medium führt zu einer Wachstumsinhibierung des Pilzes. Im Gegensatz dazu wurde die Itaconsäureproduktivität von *U. maydis* durch die Enzymmischung leicht angehoben. Auch für *U. rabenhorstiana* zeigte sich eine Steigerung der Produktivität durch die Zugabe des Enzyms. Somit sind beide Hefen bei der Verunreinigung des Mediums durch zusätzliche Ionen im Vorteil gegenüber *A. terreus* bei der Itaconsäureproduktion.

4.1.5 Synthetisches Weizenkaffhydrolysat

Weizenkaff ist ein nachwachsender Rohstoff der 2. Generation und fällt in größeren Mengen an, die aktuell nicht genutzt werden und auf dem Feld verbleiben. Für den theoretischen Vergleich der Itaconsäureproduktion auf Weizenkaffhydrolysat

wurde zunächst ein synthetisches Hydrolysat als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Dabei wurden die Monosaccharide in dem Verhältnis miteinander gemischt, welche mittels NREL-Aufschluss von Weizenkaff von Anders (2014) ermittelt wurden. Die Gesamtkonzentration der Zucker in Summe betrug 100 g/L und das Substrat bestand aus 37 g/L Glucose, 33 g/L Xylose, 25 g/L Arabinose, 7,5 g/L Galactose und 2,5 g/L Rhamnose (Anders, 2014). Zudem wurde die Itaconsäureproduktion auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat jeweils mit einer Kultivierung auf Glucose verglichen. Alle Kultivierungen wurden in Schüttelkolben durchgeführt.

4.1.5.1 Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - *U. maydis*

Die Verwertbarkeit des synthetischen Weizenkaffhydrolyсата wurde in Schüttelkolben bei 30 °C mit *U. maydis* getestet. Der Zuckerverbrauch sowie die Produktion von Itaconsäure ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Die Hefe nutzte bis zum ersten Tag nur Glucose, darauf folgte der Verbrauch von Glucose, Galactose und Xylose zeitgleich. Die Bildung von Itaconsäure begann nach ca. 1,8 Tagen Kultivierung. Glucose und Galactose waren an Tag 3 der Kultivierung aufgebraucht, anschließend wurde neben Xylose auch Arabinose verstoffwechselt, Rhamnose wurde nicht verbraucht. Die Itaconsäurekonzentration stieg kontinuierlich auf 6,7 g/L innerhalb von 7 Tagen an, was einer Produktivität von 0,04 g/(L·h) entsprach. Die Ausbeute betrug 0,07 (w/w). Neben Itaconsäure wurden 8 g/L Äpfelsäure, 5 g/L Bernsteinsäure und intrazelluläre Lipide gebildet. Im Vergleich dazu konnten parallel mit

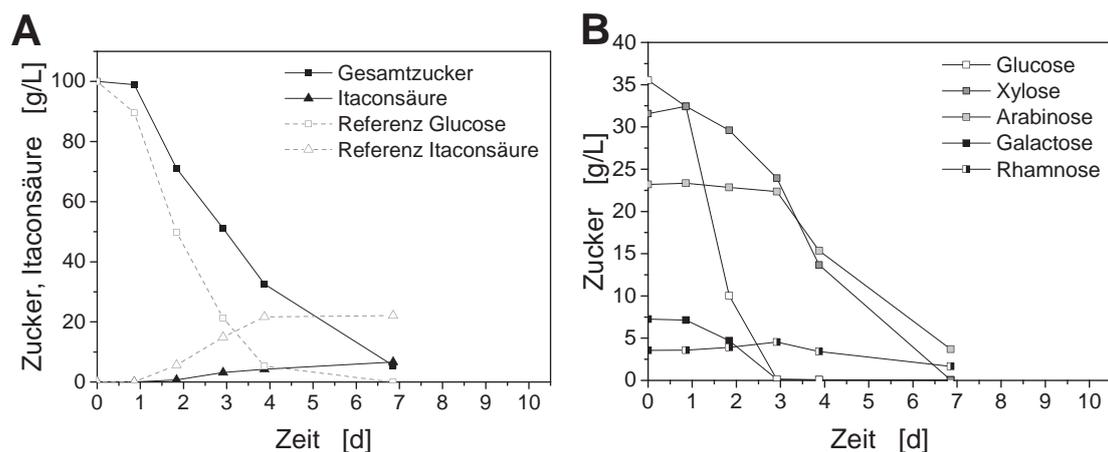


Abbildung 4.16 – Kultivierung von *U. maydis* in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 30 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.

der gleichen Konzentration Glucose innerhalb von 4 Tagen 23,5 g/L Itaconsäure gebildet werden, wobei die Produktivität 0,24 g/(L·h) und die Ausbeute 0,25 (w/w) betrug. Auch auf Glucose wurden 9 g/L Äpfelsäure gebildet und die Anreicherung von Lipiden in der Zelle mittels mikroskopischer Aufnahmen bestätigt. Insgesamt wurde mit dem synthetischen Weizenkaffhydrolysat im Vergleich zu Glucose etwa ein Drittel des Endtiters erreicht.

Im Vergleich zu der Nutzung der einzelnen Monosaccharide (Kapitel 4.1.2.1, S. 50) zeigte sich, dass alle Monosaccharide mit Ausnahme von Rhamnose für die Bildung von Itaconsäure genutzt werden konnten. Somit wurde deutlich, dass ein Co-Substrat wie Glucose für die Verwertung alternativer Monosaccharide nötig ist. Der bevorzugte Verbrauch von Glucose zu Beginn der Kultivierung ist vermutlich auf die Nutzung von Glucose und Fructose, in Form von Saccharose, in der Vorkultur zurückzuführen. Daraufhin schloss sich wahrscheinlich eine Phase an, in der sich der Metabolismus der Hefe an die Nutzung weiterer Zucker anpasste. Deutlich wird dies, da die verschiedenen Zucker unterschiedlich präferiert wurden. Bevorzugt wurde Glucose abgebaut, gefolgt von Xylose und Galactose. Arabinose wurde erst genutzt, nachdem es zu einer Limitierung von Glucose kam. Auch Klement et al. (2012) beschreibt den bevorzugten Verbrauch von Glucose bei der Verwendung von Glucose-Xylose-Mischungen als Substrat. Glucose wurde in Tests von Klement et al. (2012) deutlich schneller abgebaut als Xylose und mit zunehmendem Anteil der Xylose im Medium sank die Itaconsäurekonzentration. Insgesamt betrachtet zeigte die Kultivierung von *U. maydis* auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat, dass die Hefe die theoretisch enthaltenen Zucker verstoffwechseln kann, jedoch im Vergleich zu Glucose mit realen Hydrolysaten eine deutlich reduzierte Produktivität, Ausbeute und Endkonzentration zu erwarten ist.

4.1.5.2 Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - *U. rabenhorstiana*

Synthetisches Weizenkaffhydrolysat wurde ebenfalls mit *U. rabenhorstiana* im Schüttelkolben bei 30 °C und 120 rpm als Substrat im Vergleich zu Glucose parallel getestet (Abbildung 4.17). Nach etwa einem Tag startete die Itaconsäureproduktion, wobei in diesem Zeitraum hauptsächlich Glucose genutzt wurde. Ab Tag 2 wurden Glucose, Xylose, Arabinose und Galactose parallel von der Hefe genutzt und die Itaconsäurekonzentration stieg kontinuierlich auf 15,9 g/L innerhalb von 6,8 Tagen an. Zeitgleich setzte eine Limitierung von Glucose und

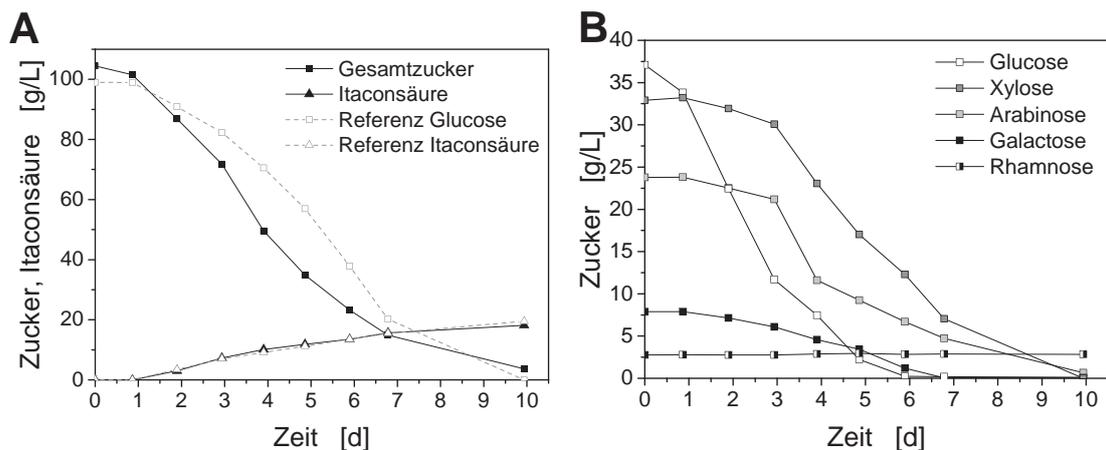


Abbildung 4.17 – Kultivierung von *U. rabenhorstiana* in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 30 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.

Galactose ein und die Produktivität sank. Arabinose und Xylose wurden innerhalb von 10 Tagen vollständig verstoffwechselt und die Itaconsäure stieg auf 18,2 g/L an. Rhamnose konnte vom Organismus nicht genutzt werden. Somit wurde eine Ausbeute von 0,18 (w/w) mit einer Produktivität von 0,08 g/(L·h) mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat erzielt. Neben Itaconsäure wurden intrazelluläre Lipide als Nebenprodukt nachgewiesen und die Bildung von 0,2 g/L Fumarsäure und 1,5 g/L Äpfelsäure. Die Kultivierung mit Glucose zeigte eine ähnliche Endkonzentration von 19,5 g/L Itaconsäure, eine Ausbeute von 0,17 (w/w) und eine Produktivität von 0,08 g/(L·h).

Die Nutzung aller Monosaccharide aus dem synthetischen Hydrolysat außer Rhamnose entsprach den Erwartungen und bestätigte die Tests auf Verwertbarkeit der einzelnen Monosaccharide (s. Kapitel 4.1.2.2, S. 52). Jedoch war anhand der unterschiedlichen Produktivitäten mit den einzelnen Zuckern nicht abzusehen, dass mit dem synthetischen Weizenkaffhydrolysat 93 % des Endtiters erzielt werden konnten wie mit Glucose. Dabei wurde deutlich, dass die Zucker effektiver zur Itaconsäureproduktion genutzt werden können, wenn Glucose als Co-Substrat im Medium vorliegt. Jedoch war auch auffällig, dass die Nebenproduktquote der organischen Säuren von 4 % mit Glucose auf 6,3 % anstieg, wobei der Anteil von Malat am stärksten zunahm. Die anfängliche ausschließliche Nutzung von Glucose im synthetischen Hydrolysat ist auf die Vorkultur mit Saccharose zurückzuführen, da Saccharose aus den Monomeren Glucose und Fructose besteht. Nach dem bevorzugten Glucoseabbau wurden alle Zucker gleichermaßen abgebaut. Dieses

Ergebnis macht deutlich, dass *U. rabenhorstiana* effektiv für die Anwendung von Weizenkaffhydrolysat als alternative Zucker aus nachwachsenden Rohstoffen eingesetzt werden kann und ohne Produktivitätsabnahme im Vergleich zu Glucose alle Zucker gleichzeitig nutzen kann.

4.1.5.3 Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - *A. terreus*

Die Kultivierung von *A. terreus* erfolgte bei 33 °C und 120 rpm in parallelen Schüttelkolben und ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Nach einem Tag keimten die Sporen aus, es wurde Itaconsäure produziert und es bildeten sich lockere Pellets, die denen auf reiner Glucose glichen (s. Abbildung 4.19 S. 77). Aus Abbildung 4.18-B geht hervor, dass in den ersten zwei Tagen hauptsächlich Glucose und etwa 1,7 g/L Xylose verbraucht wurde. Daraufhin schloss sich eine Phase an, in der Glucose, Xylose, Galactose und Arabinose parallel zur Itaconsäurebildung und zum Wachstum genutzt wurden. Nach drei Tagen war Glucose, nach 5 Tagen Galactose und nach 7 Tagen Xylose verbraucht. Gleichzeitig mit der Erschöpfung der Xylose stagnierte die Produktion von Itaconsäure, obwohl Arabinose weiter verbraucht wurde. Insgesamt wurden somit nach 7 Tagen 51,5 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,59 (w/w) und einer Produktivität von 0,31 g/(L·h) gebildet. Rhamnose wurde als Kohlenstoffquelle nicht genutzt. Mit reiner Glucose wurde ein leicht erhöhter Titer von 58,9 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,63 (w/w) und einer ähnlichen Produktivität von 0,3 g/(L·h) nach 9 Tagen erzielt.

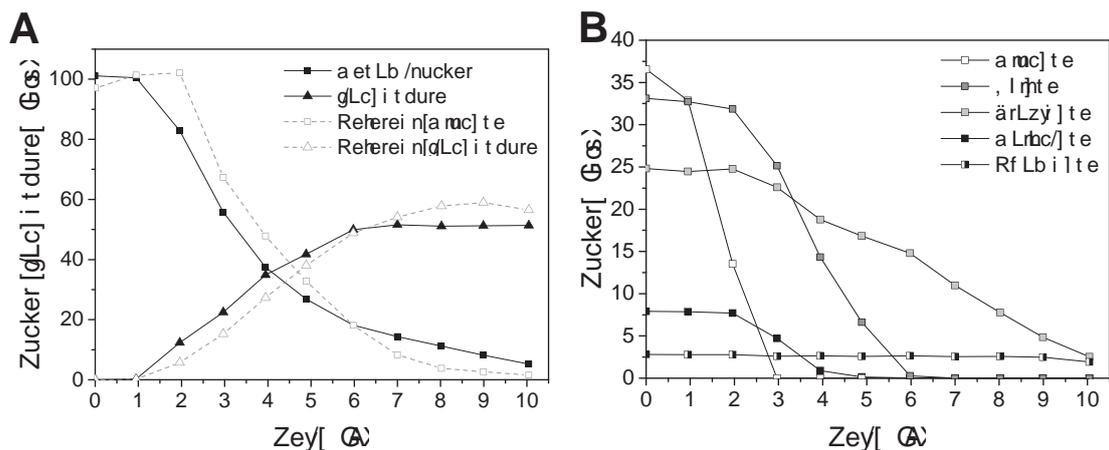


Abbildung 4.18 – Kultivierung von *A. terreus* in Schüttelkolben mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat bei 33 °C und 120 rpm. A- Vergleich von Itaconsäurekonzentration und Konzentration der Zucker der Kultivierungen auf syn. Weizenkaffhydrolysat und Glucose. B- Konzentrationsverläufe der einzelnen Monosaccharide in syn. Weizenkaffhydrolysat während der Kultivierung.

Auffällig war, dass Galactose für die Itaconsäurebildung genutzt werden konnte. Dies war als alleinige Kohlenstoffquelle nicht möglich (vgl. Kapitel 4.1.2.3, S. 55). Jedoch bestätigt dieses Ergebnis auch die Annahme, dass für die Nutzung von Galactose ein Co-Substrat wie Glucose benötigt wird. Die Stagnation der Itaconsäurebildung nach 7 Tagen zeigte, dass Arabinose als alleiniger Zucker nur noch für den Erhaltungsstoffwechsel und nicht mehr für die Itaconsäureproduktion genutzt werden konnte, sodass Itaconsäure nicht wieder abgebaut wurde. Die Kultivierung von *A. terreus* auf synthetischen Holzhydrolysaten wurde von Kobayashi (1978) beschrieben. Dabei zeigte sich ein gleiches Ergebnis, wie bei dem Vergleich von synthetischem Weizenkaffhydrolysat und Glucose in dieser Arbeit. Kobayashi (1978) erzielte dabei 90–94 % der Itaconsäurekonzentration wie auf Glucose, obwohl mit den einzelnen Monosacchariden deutlich niedrigere Titer erzielt wurden. Somit zeigt diese Arbeit in Übereinstimmung mit Kobayashi (1978), dass *A. terreus* in der Lage ist, unterschiedliche Monosaccharide parallel für die Itaconsäureproduktion zu nutzen und während der Kultivierung zwischen den einzelnen Monosacchariden zu wechseln, ohne dass es zu Produktivitätseinbußen kommt. Darüber hinaus wurden mit der Mischung an unterschiedlichen Monosacchariden, basierend auf Weizenkaff, eine ähnliche Morphologie, Titer, Produktivitäten und Ausbeuten wie auf Glucose erzielt.

Für *A. terreus* wurden weitere synthetische Hydrolysate getestet, basierend auf deren Monosaccharidzusammensetzung (Anhang B.1, S. 161), weil dieser Mikroorganismus die besten Ergebnisse auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat zeigte. Dabei wurde die Kultivierung mit Glucose mit dem bereits getesteten

Tabelle 4.4 – Vergleich der Kultivierung von *A. terreus* auf synthetischen Hydrolysaten in Schüttelkolben bei 33 °C und 120 rpm mit der Kultivierung auf reiner Glucose. Die Gesamtkonzentration der Monosaccharide betrug 100 g/L zu Beginn der Kultivierung. Die Monosaccharidzusammensetzungen sind im Anhang B.1 (S. 161) aufgelistet.

Substrat	Titer [g/L]	Produktivität [g/(L·h)]	Ausbeute [w/w _{Gesamtzucker}]
Glucose	58,9	0,28	0,59
Syn. Weizenkaffhydrolysat	51,2	0,24	0,55
Syn. Fichtenholzhydrolysat	51,6	0,22	0,56
Syn. Pappelholzhydrolysat	39,6	0,17	0,42
Syn. Orangenschalenhydrolysat	32,4	0,13	0,33

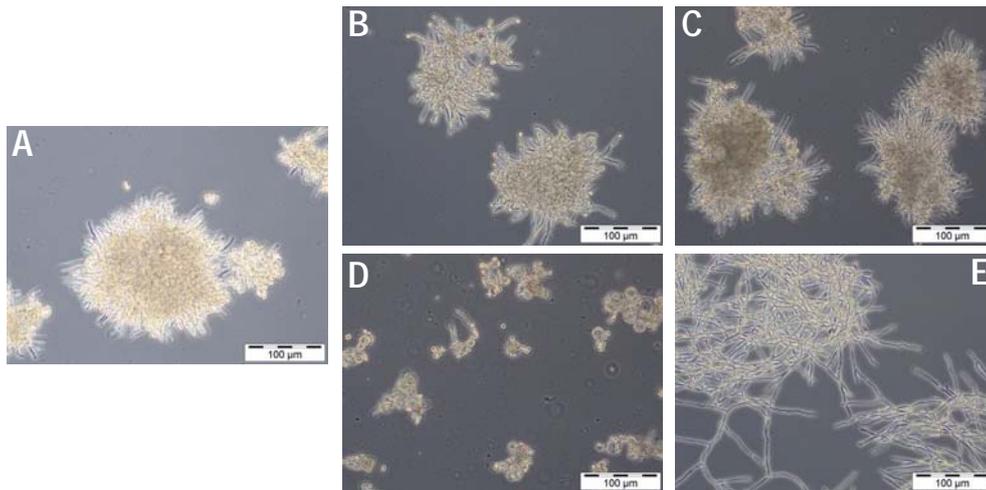


Abbildung 4.19 – Morphologie von *A. terreus* nach 3 Tagen Kultivierung bei 33 °C und 120 rpm in Schüttelkolben auf A - Glucose, B - synthetischem Weizenkaffhydrolysat, C - synthetischem Pappelholzhydrolysat, D - synthetischem Fichtenholzhydrolysat und E - synthetischem Orangenschalenhydrolysat, 200-fach vergrößert.

Weizenkaffhydrolysat sowie Orangenschalenhydrolysat, Pappelholzhydrolysat und Fichtenholzhydrolysat verglichen (s. Tabelle 4.4). Neben synthetischem Weizenkaffhydrolysat konnte mit synthetischem Fichtenholzhydrolysat eine vergleichbare Endkonzentration von 51,6 g/L im Vergleich zu Glucose und Weizenkaffhydrolysat erzielt werden. Auch die Ausbeute mit 0,56 (w/w) und einer Produktivität von 0,22 g/(L·h) waren ähnlich. Geringere Endtiter mit 39,6 g/L und 32,4 g/L wurden mit synthetischem Pappelholzhydrolysat und Orangenschalenhydrolysat erzielt. Zurückzuführen waren die abweichenden Konzentrationen im Vergleich zu Glucose auf die Morphologie. Im Vergleich zu Glucose bildeten sich mit dem synthetischen Pappelholzhydrolysat deutlich kleinere unregelmäßig ausgefrante Pellets (Abbildung 4.19-4), mit synthetischem Orangenschalenhydrolysat zeigte sich ein weitverzweigtes und lockeres Mycel (Abbildung 4.19-5). Darüber hinaus verfärbte sich das Medium nach drei Tagen mit dem Orangenschalenhydrolysat hellrot, wobei alle anderen Hydrolysate einen hellgelben Farbton, wie bei der Kultivierung mit Glucose, behielten. Zurückzuführen ist die unterschiedliche Morphologie vermutlich auf die differierenden Monosaccharidverhältnisse in den einzelnen synthetischen Hydrolysaten. Bereits der Vergleich der unterschiedlichen Monosaccharide als Kohlenstoffquelle wies grundverschiedene Morphologien auf (Kapitel 4.1.2.3, S. 55).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass *A. terreus* sehr gut geeignet ist Itaconsäure von unterschiedlichen nachwachsenden Zuckern zu produzieren. Neben

dem in dieser Arbeit näher untersuchten Hydrolysat auf Basis von Weizenkaff sollten zukünftig auch Hydrolysate auf Basis von Nadelhölzern getestet werden, da sich das synthetische Fichtenholzhydrolysat als vielversprechend hervortat.

4.1.5.4 Synthetisches Weizenkaffhydrolysat - Vergleich

Die Kultivierung mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat zeigte, dass sich die drei gewählten Mikroorganismen im Hinblick auf die Nutzung alternativer Zucker deutlich voneinander unterscheiden (s. Tabelle 4.5). Im Vergleich zur Referenz mit reiner Glucose wurden mit *U. maydis* mit dem synthetischen Hydrolysat nur 29 % der Endkonzentration erzielt, die im gleichen System mit Glucose möglich war. Bei der Nutzung der unterschiedlichen Zucker wurde deutlich, dass die Konzentrationen der Nebenprodukte (Malat und Succinat) höher waren als die Itaconsäurekonzentration. Im Gegensatz dazu wurden mit *U. rabeihorstiana* 93 % der Itaconsäureendkonzentration auf Glucose erzielt. Jedoch zeigte sich auch hier, dass die Konzentrationen der organischen Säuren als Nebenprodukte anstiegen. Auch mit *A. terreus* konnte ein vergleichbares Ergebnis wie mit *U. rabeihorstiana* erzielt werden, 87 % des Titors der Referenz mit reiner Glucose wurden erzielt. Somit lag der Vorteil bei der Verwertung von synthetischem Hydrolysat bei *U. rabeihorstiana* und *A. terreus*. Dagegen unterschieden sich der Endtiter, die Ausbeute und Produktivität von Itaconsäure deutlich voneinander. Die Endkonzentration von 51,5 g/L mit *A. terreus* ist fast dreimal so hoch wie die erzielte Itaconsäurekonzentration von *U. rabeihorstiana*. Die Ausbeute war sogar 3,5-fach

Tabelle 4.5 – Vergleich der Kultivierung von *A. terreus*, *U. maydis* und *U. rabeihorstiana* auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat in Schüttelkolben bei 33 °C bzw. 30 °C und 120 rpm.

		<i>A. terreus</i>	<i>U. maydis</i>	<i>U. rabeihorstiana</i>
Endtiter	[g/L]	51,5	6,7	18,3
Ausbeute	[w/w]	0,59	0,07	0,17
Produktivität	[g/(L·h)]	0,31	0,04	0,08
Prozentualer Anteil im Vergleich zu einer Kultivierung mit Glucose	[%]	87	29	93

so hoch und die Produktivität fast vierfach. Da *U. rabenhorstiana* neben weiteren organischen Säuren auch Lipide bildete und einlagerte, ist die geringe Ausbeute und Endkonzentration darauf zurückzuführen. Insgesamt betrachtet sollten jedoch weitere Kohlenstoffquellen und Hydrolysate für die Itaconsäureproduktion getestet werden, da diese Hefe ein vergleichsweise großes Potenzial aufwies.

4.1.6 Auswahl eines Mikroorganismus zur Kultivierung auf Weizenkaffhydrolysat

Ziel der vergleichenden Kultivierungen war es, die Vor- und Nachteile des jeweiligen itaconsäurebildenden Organismus herauszuarbeiten, mit Bezug auf die anschließende Kultivierung auf Weizenkaffhydrolysat. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 für die einzelnen Kriterien für *A. terreus*, *U. maydis* und *U. rabenhorstiana* zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich, dass *A. terreus* und *U. rabenhorstiana* im Vergleich zu *U. maydis* deutlich mehr Monosaccharide zum Wachstum und zur Itaconsäurebildung nutzen konnten. Jedoch waren beide Hefen deutlich robuster gegenüber dem Einfluss von schwachen Säuren, die durch die gewählte Vorbehandlungsmethode der Biomasse entstehen können. Zurückzuführen war dieser Effekt auf den herrschenden pH-Wert während der Kultivierung. Bei der Kultivierung von *A. terreus* lag ein pH-Wert $< \text{pH } 3,1$ vor, sodass die schwachen Säuren hauptsächlich in der undissoziierten Form vorlagen, welche in die Zelle diffundieren können und diese auf unterschiedliche Art beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum der Hefen durch den Zusatz von geringen Konzentrationen der Furanderivate inhibiert. Mit *A. terreus* konnte noch eine geringe Itaconsäureproduktion trotz inhibierender Furanderivate festgestellt werden.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Verunreinigungen im Medium durch unterschiedliche Ionen im Medium das Wachstum von *A. terreus* und die Itaconsäureproduktion sehr stark beeinflussen (Lockwood and Reeves, 1946; Batti and Schweiger, 1963; Gyamerah, 1995a; Welter, 2000; Kuenz et al., 2012; Karaffa et al., 2015). Dieses empfindliche Verhalten gegenüber Ionen aus der Enzymmischung konnte bestätigt werden, der Zusatz der Enzymmischung führte in höheren Konzentrationsbereichen sogar zur Wachstumsinhibition. Vergleichend dazu waren beide Hefen deutlich robuster, die Produktivität der Itaconsäure nahm sogar zu. Die Zunahme der Produktivität lässt darauf schließen, dass die Zusammensetzung des Tabuchi-Mediums nicht optimal war und die Hefen positiv durch die zugesetzten Ionen der Enzymmischung beeinflusst wurden.

Tabelle 4.6 – Vor- und Nachteile der itaconsäureproduzierenden Mikroorganismen *A. terreus*, *U. maydis* und *U. rabenhorstiana* auf der Basis der durchgeführten Versuche zur Nutzung von Weizenkaffhydrolysat als Substrat.
+ Vorteil, ~ neutral, - Nachteil.

	<i>A. terreus</i>	<i>U. maydis</i>	<i>U. rabenhorstiana</i>
Nutzung	+	~	+
Monosaccharide			
Einfluss			
Nebenprodukte			
schwache Säuren	-	+	+
Furanderivate	~	-	-
Verunreinigungen durch Ionen	-	+	+
synthetisches Hydrolysat			
Endkonzentration	+	-	~
Ausbeute	+	-	~
Produktivität	+	-	~

Der größte Unterschied zwischen den Hefen und dem filamentösen Pilz zeigte sich bei der Kultivierung mit synthetischem Weizenkaffhydrolysat. Mit *A. terreus* konnte eine dreimal so hohe Itaconsäurekonzentration mit einer deutlich höheren Produktivität und Ausbeute erzielt werden als mit *U. rabenhorstiana*. Wobei *U. rabenhorstiana* die höheren Ergebnisse für Ausbeute, Produktivität und Endkonzentration lieferte als *U. maydis*. Zurückzuführen sind die geringeren Endkonzentrationen und Ausbeuten der beiden Hefen vermutlich auf die Bildung und Einlagerung von Lipiden während der Kultivierung (Haskins et al., 1955). Im Gegensatz dazu lag die Bildung aller Nebenprodukte bei *A. terreus* unter 3 %.

Somit liegen die Vorteile in erzielter Endkonzentration, Produktivität und Ausbeute deutlich aufseiten des filamentösen Pilzes. Bei der Inhibierung durch die möglicherweise entstehenden Nebenprodukte in der Vorbehandlung zeigten alle drei Mikroorganismen Schwächen. Die entstehenden Zuckerabbauprodukte können jedoch durch die Wahl einer geeigneten Vorbehandlungsmethode für das Weizen-

kaff eingegrenzt werden. Aus diesen Gründen wurde *A. terreus* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt und es muss eine geeignete Vorbehandlungsmethode gewählt werden, bei der möglichst geringe Konzentrationen an inhibierenden Nebenprodukten entstehen.

4.2 Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* auf Weizenkaffhydrolysat

Für die Nutzung von Weizenkaff als Substrat für die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* muss auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 4.1 (S. 46) eine Vorbehandlungsmethode gewählt werden, bei der möglichst geringe Konzentrationen an Nebenprodukten von Zuckern und Lignin entstehen und zusätzlich die kompakte Struktur der Lignocellulose auflösen. Dabei sollte die anschließende enzymatische Hydrolyse effektiv sein und hohe Zuckerausbeuten bzw. -konzentrationen erzielen, die für die folgende Itaconsäurebildung mit *A. terreus* genutzt werden können. Dazu wurde in dieser Arbeit eine alkalische Vorbehandlung schrittweise untersucht und ein Verfahren entwickelt, Weizenkaff als Substrat für die Itaconsäureproduktion nutzbar zu machen.

4.2.1 Charakterisierung des Weizenkaffs

Das verwendete Weizenkaff der Erntejahre 2014 und 2015 enthielt, neben dem Kaff, Anteile von Halmen, Blättern und Ähren (s. Abbildung 4.20-A, S. 83). Um eine quantitative Aussage über die Anteile der Zuckermonomere im Reststoff tätigen zu können, wurde dieser mechanisch auf eine Partikelgröße ≤ 1 mm zerkleinert und ein zweistufiger Säureaufschluss nach Sluiter et al. (2008) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Weizenkaffs ist in Tabelle 4.7 im Vergleich mit Duguid et al. (2007) und Anders (2014) aufgeführt. Die Hauptbestandteile des Weizenkaffs von 2014 und 2015 waren Xylose und Glucose sowie Lignin. Des Weiteren wurden geringe Mengen Arabinose, Galactose und Rhamnose nachgewiesen. Insgesamt betrachtet ist somit eine maximale Zuckerausbeute von 0,61 g Zucker pro Gramm Weizenkaff im Mittel möglich. Die Zuckeranteile beider Erntejahre zeigten nur sehr geringe Abweichungen voneinander, wobei der Xyloseanteil mit $\pm 0,04$ g/g am stärksten betroffen war. Anders (2014) beschreibt mit 0,57 g/g eine ähnliche Zuckerausbeute für reines Weizenkaff, welches nur aus Weizenspelzen bestand und

Tabelle 4.7 – Ermittelte Zusammensetzung von Weizenkaff durch eine zweistufige Säurehydrolyse nach Sluiter et al. (2008) im Vergleich zur Literatur in g/g. * Ermittelte Konzentrationen von Glucan und Xylan in Weizenkaff von Duguid et al. (2007).

	diese Arbeit	Anders (2014)	Duguid et al. (2007)
Glucose	0,37 ± 0,02	0,23	0,32*
Xylose	0,19 ± 0,04	0,18	0,24*
Arabinose	0,03 ± 0,01	0,12	
Galactose	0,01 ± 0,01	0,03	
Rhamnose	0,01 ± 0,01	0,01	
Lignin	0,23 ± 0,02	0,24	0,18
Asche	0,07 ± 0,01	0,08	0,12
Wasser	0,09 ± 0,05	0,11	0,14

keine weiteren Pflanzenteile enthält. Im Vergleich zu den Zuckerkonzentrationen dieser Arbeit ist bei Anders (2014) der Glucoseanteil um ca. 60 % reduziert und der Arabinoseanteil um das 2,5-fache erhöht. Auch Duguid et al. (2007) wies einen Zuckeranteil von 56 % für reines Weizenkaff nach.

Die Begründung für die geringen Schwankungen in den einzelnen Zuckeranteilen für Weizen und andere Biomasse sind vielfältig. Neben Variationen in der Weizensorte können auch der Anbauort und die damit verbundenen abweichenden Bodentypen und klimatischen Bedingungen Einfluss auf die Zusammensetzung haben (Jackson, 1977; Larsen et al., 2012; Collins et al., 2014). Auch die Ernte selbst und die Lagerung der Biomasse können sich laut Liu et al. (2010) auf den Zuckeranteil und die Zuckerzusammensetzung auswirken. Zudem weisen die einzelnen Bestandteile der Weizenpflanze unterschiedliche Zuckerzusammensetzungen auf (Harper and Lynch, 1981; Duguid et al., 2007; Motte et al., 2014). Da das in dieser Arbeit verwendete Weizenkaff geringe Anteile an Halmen, Blättern und Ähren aufwies, ist die Abweichung in Zuckerzusammensetzung und Ausbeute nicht nur auf die Kultivierungsbedingungen des Weizens zurückzuführen, sondern auch auf die Erntemaschine. Die maximale Zuckerausbeute von Weizenkaff schwankt in der Literatur ebenfalls zwischen 50 und 60 % (Duguid et al., 2007; Anders, 2014; Motte et al., 2014). Somit liegt das verwendete Weizenkaff dieser Arbeit mit einer maximalen Zuckerausbeute von 61 % im oberen beschriebenen Bereich und ist deshalb als Substrat für eine Biokonversion sehr gut geeignet.

4.2.2 Alkalische Vorbehandlung des Weizenkaffs

Eine optimale Vorbehandlung hat das Ziel, die komplexe Struktur der Lignocellulose aufzubrechen, damit die anschließende enzymatische Hydrolyse effizienter abläuft. Zusätzlich sollte die Bildung von Zuckerabbauprodukten vermieden werden, sodass die Enzyme und vor allem die Mikroorganismen nicht inhibiert werden (Agbor et al., 2011). Gerade im Hinblick auf die Bildung von Zuckerabbauprodukten wurde in der Literatur nach einer Methode gesucht, die nur eine sehr geringe Bildung von Abbauprodukten aufweist, da *A. terreus* sehr sensitiv auf diese reagierte (s. Kapitel 4.1.3.3, S. 61). Eine alkalische Vorbehandlung erfüllt dieses Kriterium (Alvira et al., 2010; Menon and Rao, 2012; Kim et al., 2016). Zusätzlich wird dieser Prozess für Weizenkaff bei Raumtemperatur mit niedrigen Natriumhydroxidkonzentrationen von Duguid et al. (2007) als sehr effektiv beschrieben. Aus diesen Gründen wurden 10 % (w/w) des zerkleinerten Weizenkaffs (s. Abbildung 4.20-B) mit einer 0,25 M NaOH-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur drei Tage geschüttelt.

Nach drei Tagen zeigte sich eine dunkelbraun verfärbte, viskose Mischung aus Weizenkaffpartikeln und NaOH-Lösung. Die Fraktionen wurden durch ein Sieb voneinander getrennt. Das vorbehandelte Weizenkaff war gelb-bräunlich verfärbt

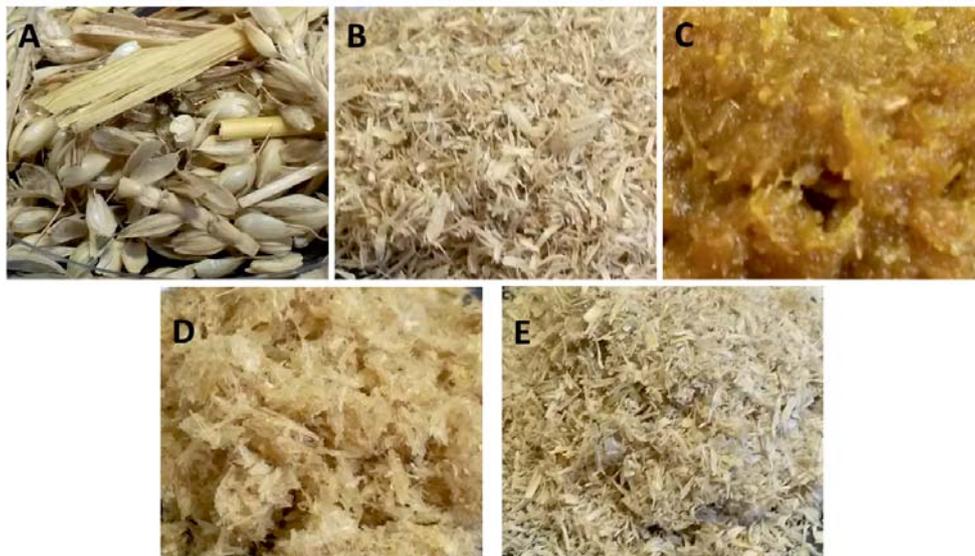


Abbildung 4.20 – Aussehen des verwendeten Weizenkaffs in den unterschiedlichen Schritten der Vorbehandlung. A - unbehandeltes Weizenkaff, B - mechanisch zerkleinertes Weizenkaff, C - Weizenkaff nach der alkalischen Vorbehandlung, D - vorbehandeltes und gewaschenes Weizenkaff, E - getrocknetes Weizenkaff nach allen Vorbehandlungsschritten.

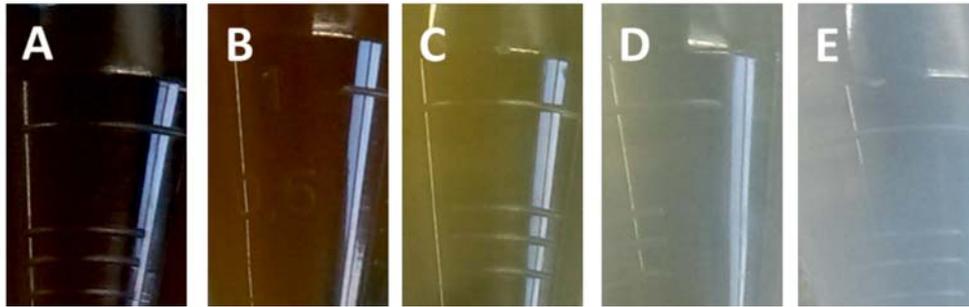


Abbildung 4.21 – A - Überstand der alkalischen Vorbehandlung von Weizenkaff nach drei Tagen mit 0,25 M NaOH bei Raumtemperatur, B bis E - Überstände der durchgeführten Waschschriffe.

(s. Abbildung 4.20-C) und die erhaltene Lösung dunkelbraun (s. Abbildung 4.21-A). Eine Analyse der Lösung mittels HPLC zeigte, dass keine Monosaccharide enthalten waren, jedoch 4,9 g/L Acetat. Auf Basis der Inhibierungsversuche wurde bereits festgestellt, dass Acetatkonzentrationen ≥ 1 g/L inhibierend für *A. terreus* sind (s. Kapitel 4.1.3.3, S. 61). Um anhaftendes Acetat, NaOH-Lösung und die bräunliche Verfärbung zu entfernen, wurde das vorbehandelte Weizenkaff mit Reinstwasser gewaschen. Die Verfärbungen der Waschlösung wurde immer geringer, bis nach vier Waschriffen keine Verfärbung mehr festgestellt werden konnte. Die Verfärbung der Überstände der einzelnen Waschschriffe sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Zudem wurde bereits nach dem zweiten Waschschriff kein Acetat mehr im Überstand detektiert. Das vorbehandelte und gewaschene Weizenkaff wurde getrocknet und unterschied sich nicht in Aussehen oder Farbe vom ursprünglich eingesetzten zerkleinerten Weizenkaff (s. Abbildung 4.20-E).

Generell betrachtet spaltet eine alkalische Vorbehandlung die Bindungen zwischen Lignin und Hemicellulose oder Lignin und Cellulose (Spencer and Akin, 1980). Dabei können Lignin, Hemicellulose, Silica, Uronsäure und Essigsäureester aus der Lignocellulose herausgelöst werden und die Cellulose quillt auf (Sun et al., 1995). Die braune Farbe der NaOH-Lösung ist auf das herausgelöste Lignin aus dem Weizenkaff zurückzuführen (Beckmann et al., 1921) und der Nachweis von Acetat auf das Lösen von Acetylgruppen der Hemicellulose (Galbe and Zacchi, 2002). Das Herauslösen dieser Substanzen weist daraufhin, dass die komplexe Struktur des Weizenkaffs verringert wurde. Zudem wurden keine Monosaccharide aus dem Weizenkaff herausgelöst, auch Duguid et al. (2007) beschreibt nur sehr geringe Zuckerverluste von etwa 3 % bei der Verwendung von milden alkalischen Bedingungen in der Vorbehandlung von Weizenstroh. Jedoch wurde ein Gewichtsverlust von ca. 10 % der ursprünglich eingesetzten Masse an Weizen-

kaff nachgewiesen. Um die genaue Zusammensetzung des vorbehandelten und gewaschenen Weizenkaffs festzustellen und das Herauslösen von Lignin nachzuweisen, wurde erneut eine zweistufige Säurehydrolyse nach Sluiter et al. (2008) durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Glucoseanteil von 0,37 g/g (vgl. Kapitel 4.2, S. 81) auf 0,48 g/g und der Xyloseanteil von 0,19 g/g auf 0,22 g/g angestiegen war. Dagegen war der Ligninanteil von 0,22 g/g auf 0,11 g/g gefallen. Somit bestätigte sich die Vermutung, dass Lignin aus dem Weizenkaff gelöst und sich in der NaOH-Lösung befand. Auch der Gewichtsverlust kann durch das Herauslösen des Lignins begründet werden (Beckmann et al., 1921). Durch die Abnahme des Ligninanteils kam es zur Zunahme des Zuckeranteils in 1 g vorbehandelten Weizenkaffs von 61 % auf 70 %. Zusammenfassend bietet somit die alkalische Vorbehandlung bei Raumtemperatur eine gute Möglichkeit, die komplexe Struktur des Weizenkaffs aufzubrechen und es fiel nur Acetat als Zuckerabbauprodukt an. Dieses konnte nachweislich durch Waschschriffe entfernt werden, um das Wachstum von *A. terreus* in einer nachfolgenden Kultivierung nicht zu inhibieren.

4.2.3 Simultane Verzuckerung und Fermentation mit alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff

Das alkalisch vorbehandelte Weizenkaff (s. Kapitel 4.2.2, S. 83) wurde für eine Simultane Verzuckerung und Fermentation mit der Enzymmischung Biogazyme 2x und *A. terreus* eingesetzt. Dabei wurde der Versuch im Schüttelkolben unter optimalen Bedingungen für den Mikroorganismus durchgeführt. Die Temperatur betrug 33 °C und der Start-pH-Wert lag bei pH 3,1. Es wurden 10 % (w/v) vorbehandeltes Weizenkaff und 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x (\cong 4,6 g/L) eingesetzt. Die Zucker- und Itaconsäurekonzentration während des SSFs sind in Abbildung 4.22-A dargestellt.

Innerhalb eines Tages wurden Glucose, Xylose und Arabinose mit einer Gesamtkonzentration von 30,4 g/L gebildet. *A. terreus* keimte nach etwa einem Tag aus und begann die gebildeten Monosaccharide kontinuierlich zu verstoffwechseln. Dabei wurde Glucose bevorzugt vor Xylose und Arabinose genutzt. Nach 4 Tagen betrug die Itaconsäurekonzentration 2,3 g/L. Es konnten zu diesem Zeitpunkt keine Monosaccharide mehr nachgewiesen werden. Ab Tag 5 sank die Itaconsäurekonzentration wieder ab. Insgesamt fiel der pH-Wert der Kultivierung von pH 3,1 auf pH 1,6 an Tag 1 ab und stieg nach 5 Tagen wieder auf pH 2,2 an. *A. terreus* wuchs in sehr großen Pellets, die Agglomerate mit den Weizenkaffpartikeln bildeten

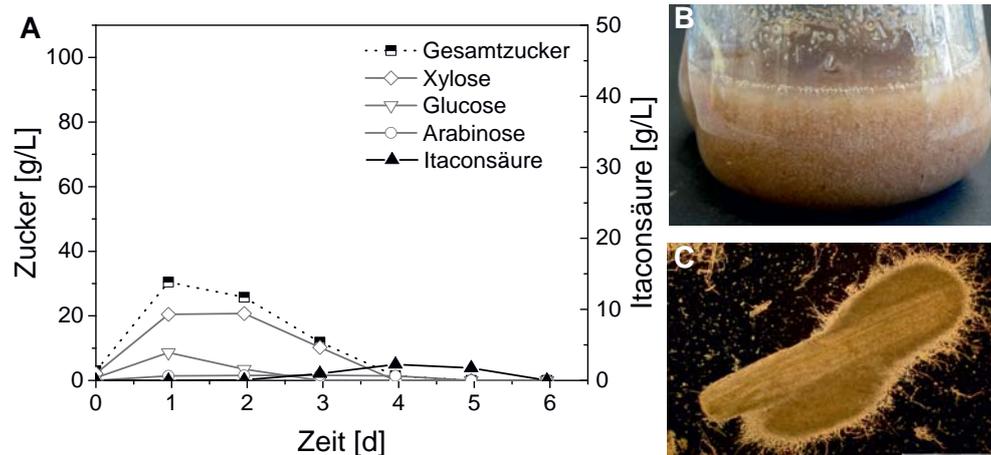


Abbildung 4.22 – A - Simultane Verzuckerung von 10 % (w/v) alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff mit 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x und Fermentation mit *A. terreus* in 250 mL Schüttelkolben bei 33 °C, 120 rpm und Start-pH-Wert von pH 3,1. B - Aufnahme des Schüttelkolbens nach 5 Tagen Kultivierung und C - Mikroskopische Aufnahme bei 50-facher Vergrößerung.

(Abbildung 4.22-B und C). Auch konnte die Bildung von Sporen nachgewiesen werden.

Ein SSF mit einer kommerziell erhältlichen Enzymmischung, wie Biogazyme 2x, und *A. terreus* ist aus der Literatur nicht bekannt. Die Bildung von 2,5 g/L zeigt, dass generell ein SSF für die Itaconsäureproduktion denkbar ist. Vermutlich lag nach 5 Tagen eine Limitierung der Monosaccharide vor, da der Zuckerverbrauch durch *A. terreus* die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme und somit die Bereitstellung einer ausreichenden Konzentration an Monosacchariden überschritt. Um die Konzentrationen der verfügbaren Zucker zu steigern, wurden folgende Ansätze theoretisch überprüft:

- **Erhöhung der Cellulaseaktivität** - Der SSF lief unter optimalen Bedingungen für den Mikroorganismus ab (33 °C, Start-pH 3,1). Das Optimum der Cellulasen, welches nach Ghose (1987) bestimmt wurde, wich deutlich davon ab und lag bei 50 °C und pH 4,8. Die Absenkung von pH-Wert und Temperatur führte nachweislich zu einer Reduzierung der Cellulaseaktivität um 74 %. Zusätzlich setzten die Salze des Mediums die Aktivität weiter herab. Somit betrug die Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x im Medium von *A. terreus* bei einem Start-pH von pH 3,1 und einer Temperatur von 33 °C nur noch bei 22 % der unter optimalen Bedingungen erzielten Aktivität. Eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf max. 35 °C wäre möglich, jedoch sinkt ab 37 °C die Itaconsäureproduktivität und die Ausbeute von *A. terreus* wieder

ab (Hevekerl, 2016). Auch der sehr niedrige Start-pH-Wert von pH 3,1 und das weitere Absinken auf $< \text{pH } 2$ ist essenziell für die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus*. Larsen and Eimhjellen (1955) beschreiben, dass der Organismus nur imstande ist Itaconsäure zu produzieren, wenn der Pilz bei niedrigen pH-Werten gewachsen ist, um nötige Enzym-Systeme zu bilden. Hevekerl et al. (2014b) bestätigt diese essentielle pH-Wert-Absenkung. Aus all diesen Gründen war es nicht möglich, die Temperatur oder den pH-Wert deutlich anzuheben, um die Cellulaseaktivitäten von Biogazyme 2x zu steigern.

- **Erhöhung der Enzymkonzentration** - Um die Gesamtaktivität der Cellulase zu steigern, könnte die Enzymkonzentration erhöht werden. Aufgrund von inhibierenden Substanzen in der Enzymformulierung wurde festgelegt, dass ein Einsatz von $> 10 \text{ FPU/g}_{\text{Biomasse}}$ Biogazyme 2x ($> 4,6 \text{ g/L}$) keine ausreichenden Itaconsäuretitern und Ausbeuten erzielt (s. Kapitel 4.1.4.3, S. 70). Die einzige Möglichkeit wäre, die hauptsächlich inhibierenden Ionen mittels Ionentauscher zu entfernen, sodass eine höhere Enzymkonzentration eingesetzt werden könnte. Laut Lynd et al. (2002) liegen typische wirtschaftliche Cellulasekonzentrationen bei der Hydrolyse bei $10 \text{ FPU/g}_{\text{Biomasse}}$. Die Erhöhung der Cellulasekonzentration und der Einsatz von Ionentauschern würde zu einer deutlichen Erhöhung der möglichen Kosten führen. Aus diesem Grund wurde auch diese Möglichkeit als nicht zielführend eingestuft.
- **Einsatz anderer kommerziell erhältlichen Enzymmischungen** - Auch der Einsatz von weiteren kommerziell erwerblichen Enzymmischungen, wie Celluclast 1.5L oder CelliCtec2 von Novozymes (Dänemark), wurde in Betracht gezogen. Nach Lan et al. (2013) liegt tendenziell aber der optimale pH-Bereich für die Hydrolyse von Lignocellulose solcher Enzymmischungen zwischen pH 5,2–6,2. Aktuell ist keine Enzymmischung (Cellulasen, Xylanasen und β -Glycosidasen) bekannt, die eine ausreichende Aktivität bei niedrigen Temperaturen im Bereich von 30–40 °C und einem pH-Bereich von pH 1,6–2,2 aufweist. In Zukunft sollte daher ein Screening nach potenziellen Cellulasen im niedrigen pH-Bereich durchgeführt werden, um einen SSF mit *A. terreus* realisieren zu können.

Um die Itaconsäureproduktion von Weizenkaff in einem SSF zu steigern, ist eine Erhöhung der Zuckerkonzentration nötig. Da aber weder der pH-Wert oder die Temperatur deutlich erhöht, die Enzymkonzentration angehoben, noch eine

andere Enzymmischung eingesetzt werden konnte, um eine gesteigerte Cellulaseaktivität zu erzielen, wurde in dieser Arbeit das Konzept des SSF nicht weiter betrachtet. Prinzipiell ist ein SSF mit *A. terreus* für die Itaconsäureproduktion von Weizenkaff vorstellbar, wenn eine Mischung aus Cellulasen, Xylanasen und β -Glycosidasen gefunden wird, die im pH-Bereich von pH 1,6–2,2 ausreichende Aktivitäten aufweist.

4.2.4 Separate Hydrolyse und Fermentation mit alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff

Neben dem SSF wurde die Separate Hydrolyse des Weizenkaffs und die anschließende Fermentation von *A. terreus* auf dem Hydrolysat untersucht (SHF). Dazu wurden alle Teilschritte dieses Verfahrens untersucht und die abschließende Bioconversion im Bezug auf Itaconsäuretiter und Ausbeute optimiert.

4.2.4.1 Enzymatische Hydrolyse von Weizenkaff

Für die Nutzung von Weizenkaff als Substrat für die Produktion von Itaconsäure mit *A. terreus* ist neben einer effizienten Vorbehandlung auch eine anschließende enzymatische Hydrolyse nötig, damit die enthaltenen Polysaccharide als Monosaccharide vorliegen und somit vom Pilz verstoffwechselt werden können. Dazu wurde in dieser Arbeit die Enzymmischung Biogazyme 2x verwendet, deren Verwendung bereits von Anders (2014) genauer untersucht wurde. Neben Exo- und Endoglucanasen enthält Biogazyme 2x auch β -Glycosidasen und ist aus diesem Grund ein geeignetes Cellulasensystem zur Hydrolyse von Cellulose (Lynd et al., 2002). Des Weiteren sind neben Cellulasen auch Xylanasen enthalten, sodass eine Hydrolyse von Hemicellulose- und Cellulosefraktion des vorbehandelten Weizenkaffs zu erwarten war.

Die Hydrolyse wurde in Schüttelkolben unter optimalen Bedingungen nach Anders (2014) (pH 4,8 und 50 °C, ohne Zugabe von Puffer) mit einer Cellulaseaktivität von 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x (\cong 4,6 g/L) durchgeführt. Eine höhere Enzymkonzentration war nicht möglich, da enthaltene Ionen in Biogazyme 2x die anschließende Kultivierung von *A. terreus* negativ beeinflussten (s. Kapitel 4.1.4.3, S. 70). Der Hydrolyseverlauf ist anhand der Zuckerkonzentrationen in Abbildung 4.23 dargestellt. Bereits nach einem Tag der Hydrolyse konnten 18,2 g/L Xylose, 17,3 g/L Glucose und 0,8 g/L Arabinose nachgewiesen werden. Die Xylose-

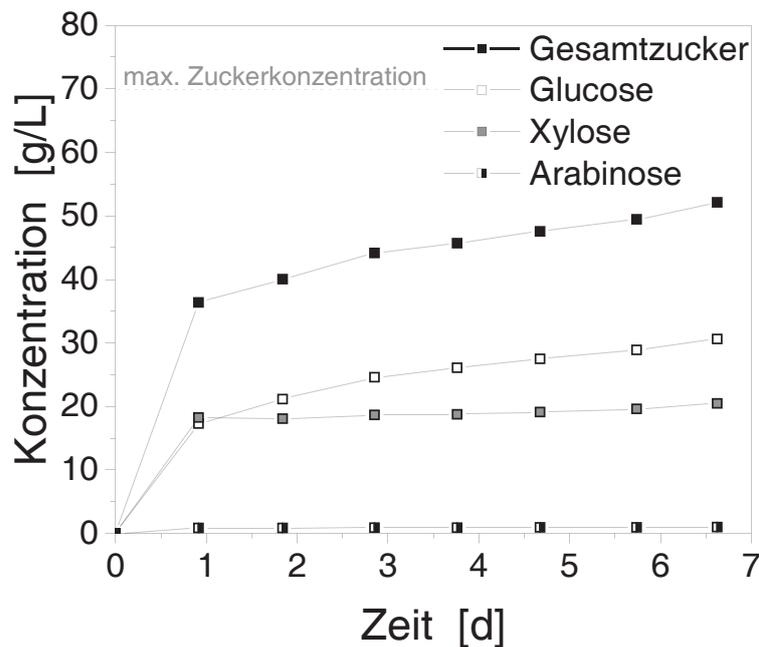


Abbildung 4.23 – Enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff im Schüttelkolben mit 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x. Feststoffanteil 10 % (w/v), pH 4,8, 50 °C und 120 rpm.

und Arabinosekonzentration stiegen daraufhin nur noch langsam auf 20,4 g/L und 1 g/L Arabinose nach 6,6 Tagen an. Dagegen nahm die Glucosekonzentration konstant über 6,6 Tage zu und betrug abschließend 30,6 g/L. Die anfängliche sehr starke Zunahme und anschließende Stagnation der Xylosekonzentration war mit der um knapp 500-fachen Enzymaktivität der Xylanasen im Vergleich zu den Cellulasen in Biogazyme 2x zu begründen (Anders, 2014). Auch kann Hemicellulose deutlich einfacher hydrolysiert werden im Vergleich zu Cellulose, welche aufgrund der teilweise kristallinen Struktur schwerer zugänglich ist (Wyman et al., 2005). Somit wurde innerhalb des ersten Tages 83 % der theoretisch möglichen Xylosekonzentration erzielt. Insgesamt wurde eine Zuckerkonzentration von 52 g/L durch die Hydrolyse mit Biogazyme 2x von alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff erhalten, was einer Zuckerausbeute von 73 % entsprach. Es zeigte sich ein typischer Sättigungsverlauf der Gesamtzuckerkonzentration bei einer enzymatischen Hydrolyse von Biomasse, bedingt durch Enzymkinetik und Produkthemmung der Enzyme (Philippidis et al., 1993; Mosier et al., 1999).

Die anfänglich eingesetzte Masse an vorbehandeltem Weizenkaff nahm augenscheinlich über die Hydrolysezeit ab, verflüssigte sich und das Hydrolysat wurde milchig-graubraun (s. Abbildung 4.24-A). Dabei wurde die detektierte Glucose hauptsächlich aus der Cellulose und Xylose, sowie Arabinose aus der Hemicellulose



Abbildung 4.24 – A - Beginn der Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenkaff, B - Weizenkaffhydrolysat nach 6,6 Tagen mit Biogazyme 2x bei 50 °C und pH 4,8, C - Weizenkaffhydrolysat nach der Abtrennung des nicht-hydrolysierten Weizenkaffs, D - konzentriertes Weizenkaffhydrolysat.

hydrolysiert (Jönsson et al., 2013), was zur Auflösung der Lignocellulosestruktur führte. Die braune Färbung des Hydrolysats lässt vermuten, dass sich Ligninbestandteile in Lösung befanden (Beckmann et al., 1921; Wyman et al., 2005). Bei Abbruch der Hydrolyse nach 6,6 Tagen waren weiterhin Partikel im Hydrolysat enthalten (s. Abbildung 4.24-B). Anhand der zweistufigen Säurehydrolyse nach Sluiter et al. (2008) wurde ermittelt, dass 1 g der nicht hydrolysierten Partikel aus 14 % Lignin, 18 % Xylose und 45 % Glucose bestanden. Die Zusammensetzung der eingesetzten vorbehandelten Partikel unterscheidet sich kaum von den Reststoffpartikeln. Damit waren in dieser nicht hydrolysierten Biomasse Weizenkaffpartikel, die trotz Vorbehandlung weiterhin als komplexe Struktur von Lignin, Cellulose und Hemicellulose vorlagen, und begründeten die Zuckerausbeute von nur 74 %. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Duguid et al. (2007), der eine Zuckerausbeute von durchschnittlich 73 % mit alkalisch vorbehandelten Weizenstrohkomponten erhielt. Darüber hinaus entsprach das Verhältnis der gewonnenen Monosaccharide dem Verhältnis der zuvor durchgeführten Zuckeranalyse im vorbehandelten Weizenkaff (Kapitel 4.2.2, S. 83). Die Hauptbestandteile waren Glucose und Xylose sowie ein geringer Anteil Arabinose. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die gewählte alkalische Vorbehandlung und die anschließende enzymatische Hydrolyse eine ausreichend hohe Zuckerkonzentration mit 52 g/L für die Kultivierung mit *A. terreus* erzielt wurde und der filamentöse Pilz alle nachgewiesenen Monosaccharide für die Bildung von Itaconsäure verstoffwechseln kann (s. Kapitel 4.1.2.3, S. 55).

4.2.4.2 Biokonversion von Weizenkaffhydrolysat

Das in Kapitel 4.2.4.1 hergestellte Hydrolysat wurde als Substrat für die Kultivierung mit *A. terreus* genutzt und die Medienkomponenten hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei 33 °C und 120 rpm in Schüttelkolben,

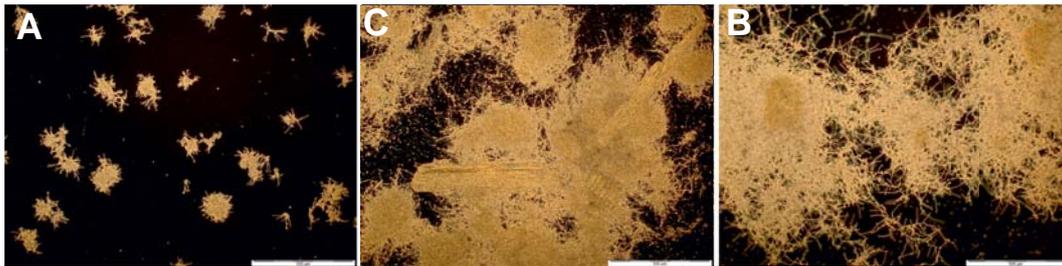


Abbildung 4.25 – Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierung im Schüttelkolben von *A. terreus* bei 33 °C und 120 rpm nach 4 Tagen. A - mit Glucose, B - Weizenkaffhydrolysat C - Weizenkaffhydrolysat ohne Reststoffe; 50-fach vergrößert.

wobei die Gesamtzuckerkonzentration zu Beginn der Kultivierung 49 g/L betrug. Nach 4 Tagen waren alle Zucker verbraucht und es konnten 0,6 g/L Itaconsäure nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kultivierung auf Glucose mit gleichmäßigen Pellets zeigten sich sehr große unregelmäßige Pellets. Teilweise waren Weizenkaffpartikel in den Pellets eingeschlossen und es hatten sich Sporen gebildet (Abbildung 4.25-B). Die typischerweise gelblich gefärbte Fermentationsbrühe hatte sich orange-rot verfärbt, wobei sich augenscheinlich sehr viel Pilzbiomasse gebildet hatte und die Brühe sehr dickflüssig war. Für folgende Versuche wurden die nicht hydrolysierten Weizenkaffpartikel aus dem Hydrolysat mittels Zentrifugation entfernt. Das Hydrolysat enthielt jedoch weiterhin Trübstoffe, die weder abgefiltert noch abzentrifugiert werden konnten (s. Abbildung 4.24-C). Zwar wurde durch das Abtrennen der Partikel die Itaconsäureproduktion auf 2,1 g/L nach 4 Tagen gesteigert, aber auch hier unterschied sich die Morphologie und die Farbe der Fermentationsbrühe von der optimalen Morphologie im Schüttelkolben. Es hatte sich im rot-orangefarbenen Medium ein stark verzweigtes und dichtes Mycel sowie Sporen gebildet (Abbildung 4.25-C).

Aufgrund der gewählten Vorbehandlung und der Waschschriffe konnte ausgeschlossen werden, dass Zuckerabbauprodukte im Hydrolysat die Kultivierung mit *A. terreus* beeinflussten. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Ligninbestandteile oder Polysaccharide im Hydrolysat enthalten waren. Auch sprach die Trübung des Hydrolysats dafür, dass Verunreinigungen enthalten waren. Des Weiteren könnten Ionen aus der Biomasse selbst in größeren Konzentrationen im Hydrolysat enthalten sein. Ionen beeinflussen die Morphologie des Pilzes stark (Lockwood and Reeves, 1946; Batti and Schweiger, 1963; Gyamerah, 1995a; Welter, 2000; Kuenz et al., 2012; Karaffa et al., 2015), sodass der Itaconsäuretiter und die Ausbeute reduziert werden. Aufgrund der überdurchschnittlichen Biomassebildung als freies Mycel stieg wahrscheinlich die Viskosität des Mediums und der

Transport von Sauerstoff aus der Gasphase in die Flüssigphase wurde geringer (Papagianni, 2004). Auch bei der Ausbildung von sehr großen Pellets kommt es zu Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung für die Pilzbiomasse (Gibbs et al., 2000). Das Innere des Pellets wird nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, wird inaktiv oder stirbt ab (Papagianni, 2004; Driouch et al., 2011). Eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung ist bei der Kultivierung von *A. terreus* für die Itaconsäureproduktion unabdingbar, da der Organismus diese für die Versorgung mit ATP benötigt, um den cytoplasmatischen pH-Wert gegenüber dem niedrigen pH-Wert im Medium konstant zu halten (Gyamerah, 1995a; Kuenz, 2008). Zusammengefasst basiert die Unterversorgung der Zelle mit Sauerstoff auf der veränderten Morphologie, die wieder bedingt durch Verunreinigungen im Hydrolysat ausgelöst wurde. Aus diesem Grund wurden vermutlich nur 0,6 g/L und 2,1 g/L Itaconsäure im Hydrolysat gebildet, obwohl alle enthaltenen Zucker verbraucht wurden.

4.2.4.3 Biokonversion von konzentriertem Weizenkaffhydrolysat

Neben dem Proteinanteil des verwendeten Enzyms im Hydrolysat, enthält das Weizenkaff selbst auch Proteine mit einem Anteil von ca. 5 % (McCartney et al., 2006), die eventuell die Itaconsäurebildung auf dem Weizenkaffhydrolysat negativ beeinflussen. Zur Denaturierung der Proteine wurde das Weizenkaffhydrolysat auf 100 °C erwärmt. Im Hydrolysat bildete sich ein gallertartiger hellbrauner Niederschlag, welcher mittels Zentrifugation abgetrennt werden konnte. Das so erhaltene Weizenkaffhydrolysat war eine klare gelbliche Flüssigkeit (s. Abbildung 4.24-D, S. 90). Nach Bradford (1976) wurde der Proteingehalt vor und nach dem Erhitzen bestimmt. Die Proteinkonzentration sank von 0,58 g/L auf 0,18 g/L. Zusätzlich wurde das Hydrolysat eingedampft, somit das Volumen des Hydrolysats halbiert und die Gesamtzuckerkonzentration von 52 g/L auf 100 g/L erhöht. Dieses Hydrolysat wurde mit Medienbestandteilen versetzt, der pH-Wert auf pH 3,1 abgesenkt und im Schüttelkolben bei 33 °C und 120 rpm für die Kultivierung mit *A. terreus* getestet (s. Abbildung 4.26). Das Hydrolysat enthielt zu Beginn der Kultivierung 46,9 g/L Glucose, 38,7 g/L Xylose und 2,1 g/L Arabinose. *A. terreus* keimte auf dem Hydrolysat aus und bildete größere Pellets mit einem Durchmesser von ca. 500 µm. Dabei konnte nach etwa einem Tag Itaconsäurebildung nachgewiesen werden, wobei die Konzentration auf 23,3 g/L innerhalb von 6 Tagen anstieg. Alle Monosaccharide wurden verbraucht, eine Glucoselimitierung trat nach 4 Tagen und eine Xyloselimitierung nach 6 Tagen auf. Die Ausbeute lag bei 0,27 (w/w).

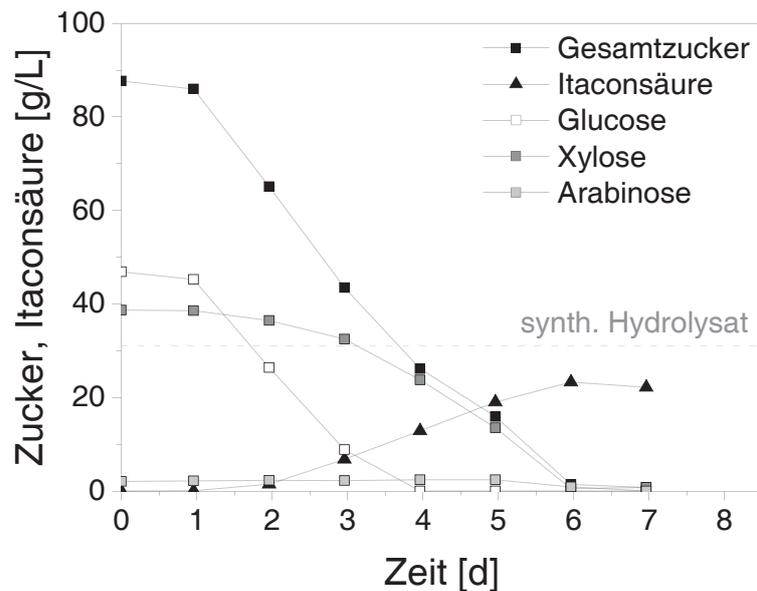


Abbildung 4.26 – Kultivierung von *A. terreus* bei 33 °C und 120 rpm im Schüttelkolben mit Weizenkaffhydrolysat. Die gestrichelte Linie stellt die maximal erzielte Itaconsäurekonzentration da, die mit dem entsprechenden synthetischen Hydrolysat erzielt wurde.

Nach vier Tagen verfärbte sich das gelbe Medium orange-rot und der Pilz bildete Sporen.

Durch das Erhitzen des Hydrolysats konnten offensichtlich Störstoffe für die Itaconsäureproduktion entfernt werden und somit die Itaconsäurebildung von 2,1 g/L auf 23,3 g/L gesteigert werden. Die abgetrennte gallertartige Masse lässt vermuten, dass nicht nur das denaturierte Protein abgetrennt wurde, sondern eventuell auch Kieselsäure, Lignin oder Polysaccharide, die alle dreidimensionale Netzwerke ausbilden können (Beckmann et al., 1921; Cannell, 1998; Wüstenberg, 2013; Diao et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde der abgetrennte Feststoff nicht weiter charakterisiert, da das Hauptaugenmerk auf der verbesserten Itaconsäureproduktion mit Weizenkaffhydrolysat lag. Jedoch sollte für zukünftige Anwendungen der ausgefallene Reststoff genauer untersucht werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese abgetrennte Verunreinigung häufig die Itaconsäureproduktion auf alternativen Substraten stört. Insgesamt ist es gelungen ein Hydrolysat aus Weizenkaff zu erhalten, dass von *A. terreus* für die Itaconsäurebildung effizient genutzt werden kann. Verglichen mit einem nachempfundene synthetischen Hydrolysat ohne Verunreinigungen konnten 76 % der zu erwartenden Itaconsäurekonzentration erzielt werden.

4.2.4.4 Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungsoptionen

Das aufkonzentrierte Weizenkaffhydrolysat konnte zwar erfolgreich für die Itaconsäureproduktion genutzt werden, jedoch zeigte sich eine abweichende Morphologie verglichen mit der Morphologie auf synthetischem Weizenkaffhydrolysat. Zudem wurden nur 76 % der zu erwartenden Itaconsäurekonzentration auf dem aufgereinigten Weizenkaffhydrolysat erzielt. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass Verunreinigungen evtl. bedingt durch Ionen aus dem Weizenkaff und der Enzymmischung die Morphologie und somit die Itaconsäurebildung weiterhin stören. In der Literatur wird für die Nutzung alternativer Substrate, wie Melassen oder Hydrolysate, eine Aufreinigung mit Ionentauschern oder Ferrocyanid als unbedingt erforderlich beschrieben, um eine ausreichende Produktivität zu erzielen (Kane et al., 1945; Lockwood and Reeves, 1946; Batti and Schweiger, 1963; Kobayashi, 1978; Tippkötter et al., 2014). Aus diesem Grund wurde das aufkonzentrierte Weizenkaff mittels Aktivkohle (A), Kationentauscher (K) und einer Kombination aus beiden Einzelschritten (A + K) aufgereinigt. Das so erhaltene Hydrolysat wurde mit Mediumkomponenten versetzt und mittels einer Kultivierung in Mikrotiterplatten bei 33 °C und 950 rpm mit einem synthetischen Hydrolysat verglichen (Abbildung 4.27).

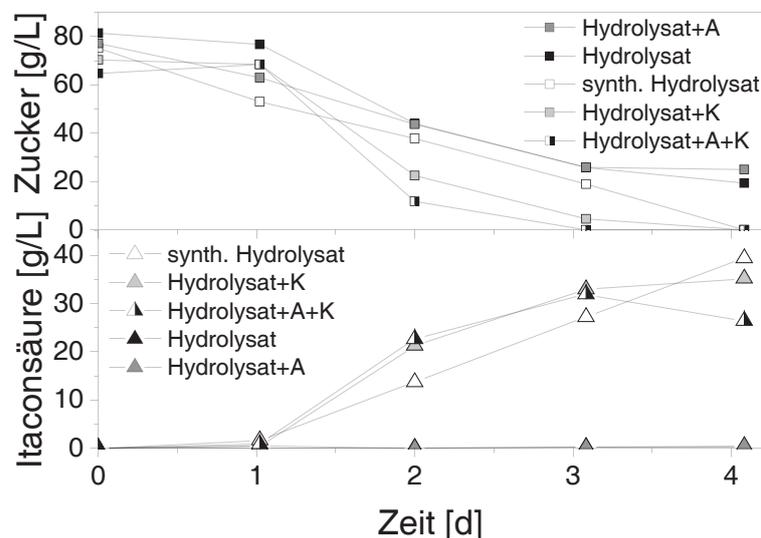


Abbildung 4.27 – Kultivierung von *A. terreus* bei 33 °C und 950 rpm in Mikrotiterplatten mit aufkonzentriertem Weizenkaffhydrolysat, behandeltes Weizenkaffhydrolysat mit Aktivkohle (A), mit Kationentauscher (K) und mit Aktivkohle und Kationentauscher (A+K). Als Referenz diente ein synthetisches Hydrolysat.

Abweichend zur Kultivierung im Schüttelkolben mit dem aufkonzentrierten Weizenkaffhydrolysat konnte in den Mikrotiterplatten keine Itaconsäure produziert werden. Die Begründung liegt in der Bildung eines Oberflächenmycels nach einem Tag und ist vermutlich auf das veränderte Kultivierungssystem zurückzuführen. Bereits im Schüttelkolben waren sehr große Pellets mit einem Durchmesser von $> 500 \mu\text{m}$ festgestellt worden. Auch im Hydrolysat, das mit Aktivkohle behandelt wurde, bildete sich ein Oberflächenmycel und Itaconsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Hydrolysaten, die zuvor mittels Kationentauscher und einer zweistufigen Aufreinigung über Aktivkohle und Kationentauscher behandelt wurden, nach 3,1 Tagen eine Konzentration von etwa 32 g/L Itaconsäure nachgewiesen. Es hatten sich Pellets mit einem Durchmesser von $100\text{--}200 \mu\text{m}$ gebildet und beide Kultivierungen verliefen in der Itaconsäurebildung und Zuckeraufnahme gleich. Auf dem synthetischen Hydrolysat war die Produktivität leicht reduziert, daher wurde nach 3,1 Tagen nur eine Konzentration von $27,2 \text{ g/L}$ erreicht. Die Pellets hatten einen ähnlichen Durchmesser, wie die Pellets auf dem gereinigten Hydrolysat mittels Kationentauscher. Dieser Vergleich machte deutlich, dass die Verwendung eines Kationentauschers ausreichte, störende Ionen aus dem Hydrolysat zu entfernen, um ähnliche Konzentrationen wie auf dem synthetischen Weizenkaffhydrolysat zu erzielen. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt über Aktivkohle war nicht notwendig.

4.2.4.5 Bestimmung der kritischen Ionenkonzentrationen im Hydrolysat

Zur genaueren Eingrenzung der störenden Ionen wurde das Medium mit dem aufkonzentrierten Weizenkaffhydrolysat und den drei Aufreinigungsmöglichkeiten mittel ICP-OES vermessen, verglichen und die auffälligsten Ionenkonzentrationen in Tabelle 4.8 aufgelistet. Die Ionen wurden nicht nur durch die Enzymformulierung (s. Kapitel 4.1.4, S. 67) sondern auch durch das Weizenkaff selbst ins Hydrolysat eingetragen (McCartney et al., 2006). Die Ionenkonzentration im aufkonzentrierten Weizenkaffhydrolysat war teilweise um ein vielfaches höher als im Medium. Die um über ein 4000-faches erhöhte Mangankonzentration im Weizenkaffhydrolysat im Vergleich zum Medium wurde als besonders kritisch angesehen, da nach Karaffa et al. (2015) ein manganarmes Medium vorliegen muss, um hohe Itaconsäuretitel und Ausbeuten erzielen zu können. Konzentrationen $> 3 \mu\text{g/L}$ beeinflussen zudem die Morphologie. Auch hohe Fe^{2+} -Konzentrationen stören die Produktion von Itaconsäure mit *A. terreus* und wurden daher von Kobayashi (1978) aus einem

Tabelle 4.8 – Konzentrationen unterschiedlicher Elemente im Medium und in den aufgereinigten Hydrolysaten mit Aktivkohle (A), Kationentauscher (K) und einer zweistufigen Aufreinigung mit Aktivkohle und Kationentauscher (A+K).

Element	Medium	Weizenkaff- hydrolysat	A	K	A+K
	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]
Al	0,0442	0,8825	5,1	0,1193	0,1185
B	0,0101	0,455	0	0,3455	-
Ba	0	1,245	0,2863	0	0,0065
Fe	0,1455	1,1775	0,379	0,102	0,119
K	17,4	234	713	4,69	12
Mg	42	59	62	0,0208	0,0009
Mn	0,0004	1,7215	0,3278	0,0005	0,007
Na	0,3431	870	1280	38	39
P	20	78	53	59	55
Sr	0,1722	0,807	0,223	0,0003	0,0005

Holzhydrolysat entfernt. Darüber hinaus beschreiben Lockwood and Reeves (1946), dass weder Al^{3+} , Cr^{2+} noch B^{3+} förderlich für hohe Itaconsäureausbeuten sind. Durch die Anwendung der Aktivkohle wurden zwar die Konzentrationen von Bor-, Chrom- und Manganionen gesenkt, jedoch lag die erzielte Konzentration von Manganionen mit 328 $\mu\text{g/L}$ deutlich über der Grenze von 3 $\mu\text{g/L}$. Erst durch den Einsatz des Kationentauschers konnte die Mangankonzentration auf 0,5 $\mu\text{g/L}$ reduziert werden. An diesem Beispiel wird deutlich, dass die erzielten Titer von 32 g/L Itaconsäure auf den aufgereinigten Hydrolysaten durch den Einsatz des Ionentauschers erzielt wurden. Auch die Produktivitätssteigerung des gereinigten Hydrolysats gegenüber dem synthetischen Hydrolysats ließ sich anhand der ICP-OES-Messungen erklären. Die Phosphorkonzentration im Hydrolysat war 2- bis 3-mal so hoch wie im Medium. Kuenz (2008) und Hevekerl et al. (2014a) beschreiben eine gesteigerte Produktivität durch die Erhöhung der Phosphatkonzentration, darauf ist die leicht erhöhte Produktivität auf eine Phosphatquelle im Hydrolysat zurückzuführen.

Insgesamt lässt sich somit sagen, dass die Produktivität, Ausbeute und der Titer auf dem Weizenkaffhydrolysat durch den Einsatz einer Aufreinigung mittels Kationentauscher gesteigert werden können.

4.2.4.6 Kultivierung mit aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat

Auf Basis der Ergebnisse zur Aufreinigung des Weizenkaffhydrolyсата und der damit verbundenen Steigerung von Produktivität, Ausbeute und Endtiter, wurde das Weizenkaff mittels Kationentauscher gereinigt und in Schüttelkolben bei 33 °C und 120 rpm als Substrat verwendet (s. Abbildung 4.28). Durch die Verwendung des Ionentauschers reduzierte sich die Gesamtzuckerkonzentration im Hydrolysat auf 85,3 g/L und setzte sich zusammen aus 46,8 g/L Glucose, 38,7 g/L Xylose und 2,1 g/L Arabinose. Nach 5 Tagen der Kultivierung war die enthaltene Glucose verbraucht und die Xylosekonzentration nahm kontinuierlich weiter ab. Die maximale Itaconsäurekonzentration wurde nach 6 Tagen erzielt und betrug 27,7 g/L mit einer Ausbeute von 0,41 (w/w) und einer Produktivität von 0,19 g/(L·h). Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 80 % des Gesamtzuckers verbraucht. Trotz weiterem Verbrauch von Xylose konnte keine Konzentrationssteigerung der Itaconsäure beobachtet werden. Stattdessen wurde die Itaconsäure wieder von *A. terreus* verstoffwechselt. Während der Kultivierung zeigten sich regelmäßige Pellets mit einem Durchmesser von 150–200 µm (s. Abbildung 4.29) und die Fermentationsbrühe hatte eine gelbliche Farbe. Es konnte keine Sporulation nachgewiesen werden. Somit entsprach die Morphologie im gereinigten Hydrolysat der Morphologie im

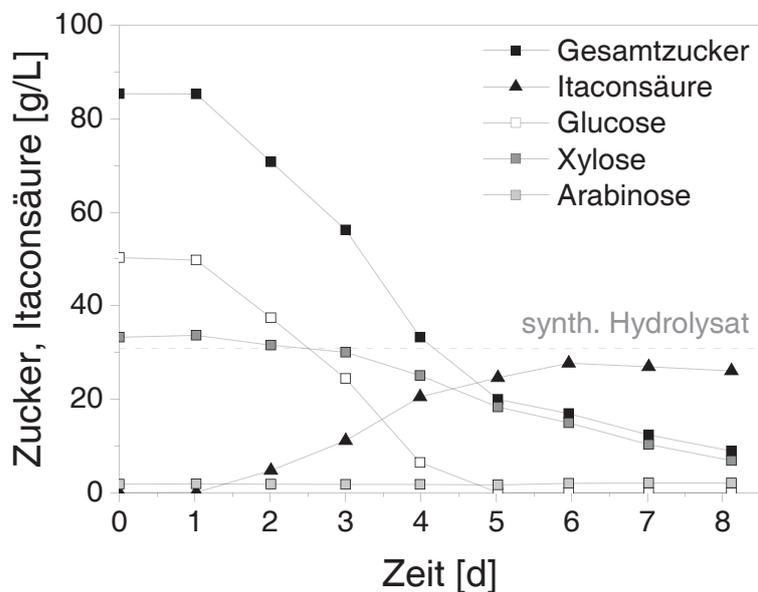


Abbildung 4.28 – Kultivierung von *A. terreus* bei 33 °C und 120 rpm im Schüttelkolben mit aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat mittels Kationentauscher. Die gestrichelte Linie stellt die maximal erzielte Itaconsäurekonzentration da, die mit dem entsprechenden synthetischen Hydrolysat erzielt wurde.

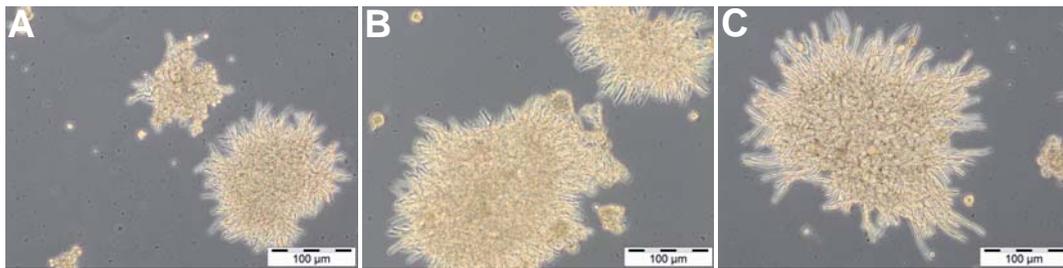


Abbildung 4.29 – Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierung im Schüttelkolben von *A. terreus* bei 33 °C und 120 rpm nach 4 Tagen. A - mit Glucose, B - gereinigtem Weizenkaffhydrolysat C - synthetischem Weizenkaffhydrolysat; 200-fach vergrößert.

synthetischen Weizenkaffhydrolysat, mit dem ein Titer von 30,6 g/L mit einer Produktivität von 0,26 g/(L·h) und einer Ausbeute von 0,49 (w/w) erzielt wurde.

Im Vergleich zum aufkonzentrierten Weizenkaffhydrolysat (s. S. 92) konnte durch den Austausch der Ionen ein um 19 % gesteigerter Titer erzielt und die Ausbeute verdoppelt werden, obwohl nur 80 % der Zucker von *A. terreus* genutzt wurden. Somit wurde das Ergebnis der Mikrotiterplattenversuche (s. S. 94) bestätigt: Die Ionen beeinflussen das Wachstum und die Itaconsäureproduktion negativ und sollten daher entfernt werden, um höhere Titer zu erzielen. Der Abbau von Itaconsäure ist aus der Literatur bekannt, die physiologische Wirkung jedoch nicht (Chen et al., 2016). Chen et al. (2016) wies drei Schlüsselenzyme für den Itaconsäureabbau in *A. terreus* nach, wobei Itaconsäure zu Itaconyl-CoA umgesetzt wird, eine Hydratisierung führt zu Citramalyl-CoA und dieses wird in Pyruvat und Acetyl-CoA gespalten. Eine Vermutung ist, dass eine weitere, bis jetzt unbekannte, Verunreinigung im Hydrolysat enthalten war oder eine Limitierung von Medienbestandteilen oder Zellmetaboliten vorlag. Somit könnte die Itaconsäure abgebaut worden sein, um einen Mangel auszugleichen. Der Abbau der Itaconsäure mit gleichzeitigem Verbrauch von Xylose wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Vermutungen bzgl. Störstoffen oder Limitierungen sollten zukünftig beim Einsatz alternativer Substrate näher betrachtet werden.

4.2.5 Prozessüberblick: Itaconsäure aus Weizenkaff

Auf Basis von Inhibierungsversuchen bezüglich kritischer Konzentrationen an Zuckerabbauprodukten, Enzymformulierung und sonstigen Störstoffen aus Weizenkaff wurde die Herstellung des Hydrolyrats schrittweise optimiert. Dies führte zu dem in Abbildung 4.30 schematisch dargestellten Prozess, mit dem erfolgreich Itaconsäure mit *A. terreus* aus Weizenkaffhydrolysat hergestellt werden konnte.

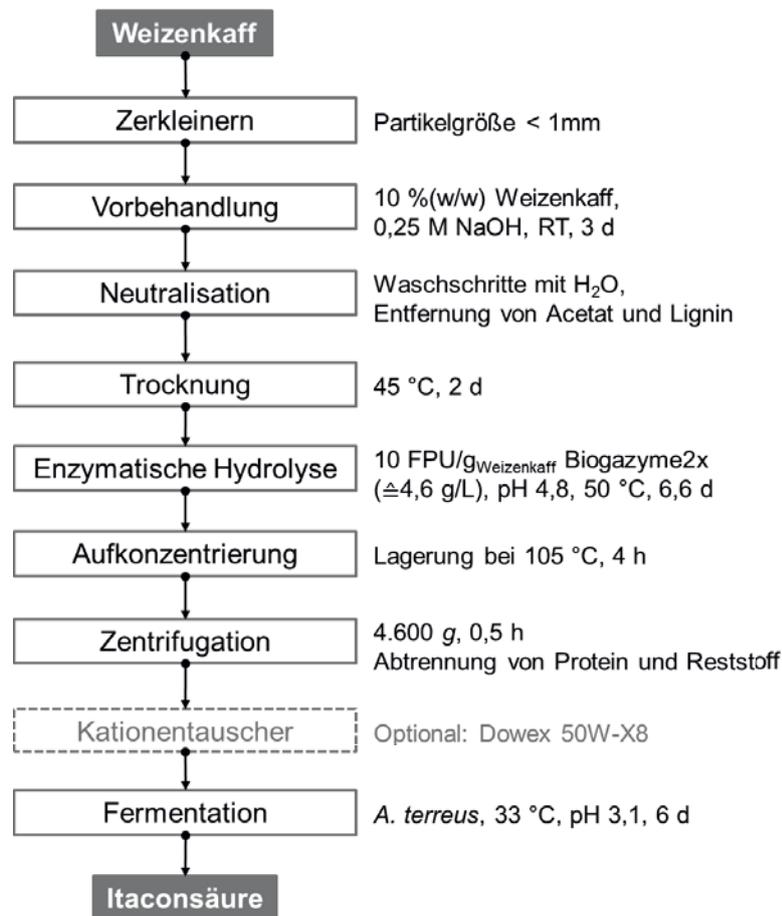


Abbildung 4.30 – Zusammenfassung des entwickelten Prozesses zur Herstellung eines Hydrolysats auf Basis von Weizenkaff und anschließender Biokonversion mit *A. terreus* zu Itaconsäure.

- Das Weizenkaff wurde zerkleinert (< 1 mm), um die spezifische Oberfläche der Weizenkaffpartikel zu vergrößern und die Kristallinität der Lignocellulose zu verringern (Hendriks and Zeeman, 2009).
- Das zerkleinerte Weizenkaff wurde bei Raumtemperatur alkalisch vorbehandelt (0,25 M NaOH). Diese Methode wurde gewählt, um die Bildung und Konzentrationen von Zuckerabbauprodukten möglichst niedrig zu halten. Als störendes Nebenprodukt für die Fermentation mit *A. terreus* entstanden 4,9 g/L Acetat. Die alkalische Vorbehandlung spaltete die Verbindungen zwischen Lignin und Hemicellulose bzw. Cellulose und setzte somit den Polymerisationsgrad weiter herab, zudem wurden Teile des Lignins aus dem Weizenkaff herausgelöst (Beckmann et al., 1921; Spencer and Akin, 1980; Sun et al., 1995). Durch das Herauslösen von Lignin kam es zu einem

Gewichtsverlust von etwa 10 % im Vergleich zur eingesetzten Masse an Weizenkaff und der Zuckeranteil wurde von 0,61 g/g auf 0,72 g/g gesteigert.

- Die gelösten Ligninbestandteile und das Acetat wurden durch die Neutralisation mit Wasser aus dem vorbehandelten Weizenkaff herausgewaschen und konnten somit die anschließende Hydrolyse sowie die Fermentation nicht negativ beeinflussen.
- Das vorbehandelte Weizenkaff wurde daraufhin getrocknet und hydrolysiert.
- Die Hydrolyse erfolgte unter optimalen Bedingungen für die Cellulasen in der Enzymmischung Biogazyme 2x (pH 4,8 und 50 °C) für 6,6 Tage mit einem Feststoffanteil von 10 % (w/v). Die Konzentration der Cellulasen betrug 10 FPU/g_{Biomasse} Biogazyme 2x, da höhere Konzentrationen der Enzymformulierung zu einem Einbruch der Produktivität an Itaconsäure in der abschließenden Fermentation führen könnten. Das Resultat der Hydrolyse war ein Weizenkaffhydrolysat mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 52 g/L, wobei die Hauptbestandteile Glucose und Xylose waren.
- Zur Konzentrierung der Zucker und der Denaturierung der Proteine (Enzyme und Proteine des Weizenkaffs) wurde das Hydrolysat erwärmt und Wasser entfernt. Der ausgefallene Feststoff und die nicht hydrolysierten Weizenkaffpartikel wurden mittels Zentrifugation abgetrennt, da dieser Feststoff zu einem verzweigten Mycelwachstum von *A. terreus* führte. Diese Wachstumsform zeigte einen deutlich geringeren Titer und eine niedrigere Ausbeute, als das gewünschte Wachstum in regelmäßigen Pellets (Gyamerah, 1995a). Die Gesamtzuckerkonzentration des Hydrolysats betrug nach der Aufkonzentrierung 100 g/L, wurde jedoch durch die Zugabe der Medienbestandteile für die Fermentation wieder auf 85 g/L verdünnt.
- Nach 6 Tagen Kultivierung von *A. terreus* auf dem Weizenkaffhydrolysat konnte 23,3 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,19 (w/w) gebildet werden.
- Durch die Entfernung unterschiedlichster Kationen aus dem Hydrolysat vor der Fermentation konnte der Titer auf 27,7 g/L angehoben und die Ausbeute deutlich auf 0,41 (w/w) gesteigert werden.

Somit ist es gelungen, mit dem aufgezeigten Verfahren Weizenkaff für die Itaconsäureproduktion mit einem Wildtypstamm von *Aspergillus terreus* nutzbar

zu machen ohne die Verwendung eines aufwendigen und mehrstufigen Aufreinigungsverfahrens. Der Einsatz eines Kationentauschers war nicht zwangsweise erforderlich, führte aber zu einer Steigerung des Titors und der Ausbeute. Wird der gesamte Prozess betrachtet, mussten somit ca. 22 g Weizenkaff mechanisch und chemisch vorbehandelt und enzymatisch umgesetzt werden, um 10 g Gesamtzucker in 100 mL Hydrolysat zu erhalten. Diese Gesamtzuckerkonzentration von 100 g/L wurde durch die Zugabe von Medienbestandteilen auf ca. 85 g/L Gesamtzucker verdünnt und zur Kultivierung von *A. terreus* verwendet. Insgesamt waren somit 220 g_{Weizenkaff}/L für die Bildung von 23,3 g/L bzw. 27,7 g/L Itaconsäure nötig.

4.2.6 Vergleich der Kultivierungen auf Weizenkaffhydrolysat mit Glucose

Typischerweise wird Itaconsäure mit den Zuckern Glucose oder Saccharose produziert, in Form von Stärkehydrolysaten, Zuckerrohr- oder Zuckerrübenmelasse, die zuvor über Ionentauscher oder Ferrocyanide aufgereinigt werden (Willke and Vorlop, 2001; Okabe et al., 2009). Aus diesem Grund ist ein Vergleich der Titer und Ausbeuten der zuvor durchgeführten Kultivierungen mit Weizenkaffhydrolysat mit der Kohlenstoffquelle Glucose gerechtfertigt. Dazu wurde eine Kultivierung im Schüttelkolben mit Glucose mit den Kultivierungen auf Weizenkaffhydrolysat, aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat und dem entsprechenden synthetischen Weizenkaffhydrolysat verglichen (s. Tabelle 4.9).

Die Konzentration der Kohlenstoffquellen im Medium betrug jeweils 85 g/L. Nach 7,5 Tagen wurde mit Glucose ein Titer von 40,2 g/L erzielt, was einer

Tabelle 4.9 – Vergleich der Kultivierungen mit *A. terreus* in Schüttelkolben nach 7,7 Tagen bei 33 °C und 120 rpm auf den Substraten Glucose, synthetischem Weizenkaffhydrolysat, gereinigtem Weizenkaffhydrolysat und Weizenkaffhydrolysat mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 85 g/L.

Substrat	IA [g/L]	Pr [g/(L·h)]	Y _{P/S} [w/w]
Glucose	40,2	0,22	0,51
Synth. Weizenkaffhydrolysat	30,6	0,26	0,49
Weizenkaffhydrolysat	23,3	0,16	0,27
Gereinigtes Weizenkaffhydrolysat	27,7	0,19	0,41

Ausbeute von 0,51 (w/w) und einer Produktivität von 0,22 g/(L·h) entsprach. Die gesamte Glucose wurde verbraucht. Mit dem Weizenkaffhydrolysat konnten lediglich 23,3 g/L Itaconsäure produziert werden. Durch die Entfernung von Kationen konnte der Titer im gereinigten Weizenkaffhydrolysat auf 27,7 g/L gesteigert werden. Auch die Ausbeute stieg von 0,27 (w/w) auf 0,41 (w/w) an. Insgesamt konnten somit 58 % des Endtiters mit Weizenkaffhydrolysat und 69 % mit gereinigtem Weizenkaffhydrolysat im Vergleich zu reiner Glucose erzielt werden. Selbst im Fall vom synthetischen Weizenkaffhydrolysat, bei dem davon ausgegangen werden konnte, dass keine Verunreinigungen im Hydrolysat vorliegen, wurden lediglich 76 % des möglichen Titors auf Glucose erzielt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass mit Zuckermischungen zwar gute Titer erzielt werden können, jedoch die Verwendung von Glucose die höchsten Werte für Titer und Ausbeute erzielt. Auch Kautola et al. (1985) und Kobayashi (1978) bestätigen, dass *A. terreus* die höchsten Titer mit Glucose erzielt. Weitere Monosaccharide erzielen deutlich geringere Ausbeuten und Titer.

Die Kultivierungen aus den Schüttelkolben sollten für eine genauere Aussage jedoch in einen Rührreaktor überführt werden. Zusätzlich sollte der Einsatz höherer Zuckerkonzentrationen untersucht werden, da sich die Ausbeute von Itaconsäure erst im Bereich von 120–200 g/L Glucose als konstant erwiesen hat (Karaffa et al., 2015). Daher ist davon auszugehen, dass durch eine Prozessoptimierung, Überführung der Kultivierung in einen größeren Maßstab und höhere Zuckerkonzentrationen die Produktion von Itaconsäure auf Weizenkaffhydrolysat weiter optimiert und gesteigert werden kann. Es ist zu vermuten, dass die Titer nicht an die Titer mit Glucose heranreichen werden, somit sollte neben den Untersuchungen von nachwachsenden lignocellulosehaltigen Rohstoffen für die Itaconsäureproduktion auch die Kultivierungen auf Glucose weiter untersucht werden, um beide Prozesse wirtschaftlicher gestalten zu können.

4.2.7 Vergleich mit der Literatur

In der Literatur sind nur sehr wenige erfolgreiche Kultivierungen von *A. terreus* für die Produktion von Itaconsäure auf lignocellulose-basierten Hydrolysaten bekannt (s. Tabelle 4.10). Hauptsächlich werden als Alternativen zu reiner Glucose oder Saccharose aufgereinigte Melassen (Kane et al., 1945; Lockwood and Reeves, 1946; Batti and Schweiger, 1963) oder Stärkehydrolysate verwendet (Yahiro et al., 1997; Petruccioli et al., 1999; Reddy and Singh, 2002; Dwiarti et al., 2007). Zudem

konnten Reddy and Singh (2002) erfolgreich Itaconsäure auf Zuckerextrakten aus Fruchtschalenabfällen produzieren. Eine Kultivierung auf Stärkehydrolysaten oder Zuckerextrakten ist deutlich erfolgreicher, da keine Zuckerabbauprodukte als Inhibitor durch harsche Vorbehandlungsbedingungen der Biomasse entstehen können. Diese harschen Bedingungen sind bei Lignocellulose dagegen notwendig, um die deutlich komplexere Struktur der Lignocellulose im Vergleich zu Stärke aufzubrechen (Jönsson et al., 2013). Die entstehenden inhibierenden Zuckerabbauprodukte oder sonstige Verunreinigungen müssen vor der Kultivierung durch meist komplexe Aufreinigungsverfahren wieder aus dem Medium entfernt werden, um eine ausreichende Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* erzielen zu können. Eine weitere Möglichkeit ist es, den Stamm gegenüber potenziellen Inhibitoren durch Mutagenese resistenter zu machen. Jedoch ist es sehr schwierig, unterschiedliche Mikroorganismen kultiviert auf verschiedenen Lignocellulosehydrolysaten mit differierenden Aufreinigungsmethoden miteinander zu vergleichen (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

Kobayashi (1978) nutzte eine mehrstufige Aufreinigung bei einem Sichel-tannenhydrolysat, um Acetat, Arsenate und Fluorosilicate aus dem Hydrolysat zu entfernen. Somit konnte ein Endtiter von 39,9 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,53 (w/w) erzielt werden. Die erreichte Endkonzentration von 23,3 g/L und 27,7 g/L Itaconsäure dieser Arbeit, sowie deren Ausbeuten liegen deutlich unter den erzielten Ergebnissen von Kobayashi (1978). Die hohen Titer und Ausbeuten sind durch die enthaltenen Zuckermonomere im Hydrolysat zu begründen. Das Sichel-tannenhydrolysat von Kobayashi (1978) bestand zu 73 % aus Glucose und 12 % Mannose. Das in dieser Arbeit verwendete Weizenkaffhydrolysat bestand nur zur Hälfte aus Glucose, die restlichen Zucker waren überwiegend Xylose und Arabinose. Glucose und Mannose haben sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Xylose und Arabinose als die Monosaccharide mit den höchsten Titern, Produktivitäten und Ausbeuten erwiesen. Somit ist die geringe Ausbeute hauptsächlich über die Effizienz der Zuckerverwertung zu begründen. Auch Tippkötter et al. (2014) konnte ohne Aufreinigung kein Wachstum von *A. terreus* auf einem Birkenholz-Cellulose-Hydrolysat nachweisen (20,5 g/L Glucose, 4 g/L Xylose). Für die Bildung von 7,2 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,3 (w/w) musste die verwendete Biomasse und das Hydrolysat gereinigt werden. Dabei wurde für die Entfernung von phenolischen Bestandteilen die vorbehandelte Biomasse mit 0,5 M NaOH bei 50 °C über Nacht gewaschen. Nach der Hydrolyse wurde Aktivkohle, ein Anionen- und Kationentauscher zur Reinigung verwendet, nur so war eine

erfolgreiche Kultivierung des filamentösen Pilzes möglich. Die erzielte Ausbeute der vorliegenden Arbeit mit Weizenkaffhydrolysat ist mit 0,27 (w/w) mit dem stark gereinigten Hydrolysat von Tippkötter et al. (2014) vergleichbar. Jedoch liegt die Produktivität auf Weizenkaffhydrolysat mit 0,16 g/(L·h) 60 % höher als mit dem Buchenholz-Cellulose-Hydrolysat. Auch Pedroso et al. (2017) beschreibt einen sehr geringen Titer von 1,9 g/L Itaconsäure auf einem Hydrolysat von Reishülsen. Durch eine vorherige Neutralisation des Hydrolysats durch Calciumoxid konnte zwar die Konzentration von Ameisensäure und Essigsäure reduziert werden, jedoch enthielt das Hydrolysat weiterhin 0,9 g/L Ameisen- und 2,2 g/L Essigsäure. Vermutlich ist die geringe Itaconsäurekonzentration auf die inhibierende Wirkung der Zuckerabbauprodukte zurückzuführen, da sich solch hohe Konzentrationen in dieser Arbeit als inhibierend herausgestellt haben.

Li et al. (2016) verwendete ein Maisstroh-Hydrolysat, das neben Glucose und Xylose auch Ameisen- und Essigsäure enthielt. Mit einem Wildtypstamm konnten lediglich 0,54 g/L Itaconsäure gebildet werden, vermutlich aufgrund der inhibierenden Wirkung der Säuren. Durch die Mutagenese des eingesetzten Stammes mittels Atmosphärischem- und Raumtemperatur-Plasma (Zhang et al., 2014), konnte die Resistenz des Stammes gegenüber den Verunreinigungen erhöht werden und der Titer auf 19,3 g/L gesteigert werden. Die erzielte Endkonzentration von Li et al. (2016) liegt zwar im Bereich der hier durchgeführten Arbeiten mit Weizenkaffhydrolysat, jedoch ist die Ausbeute im Vergleich mit 0,36 (w/w) deutlich erhöht. Eine Steigerung der Ausbeute konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem Einsatz eines Ionentauschers erzielt werden und ist mit 0,41 (w/w) im Bereich der verwendeten Mutante von Li et al. (2016). Durch die Verwendung von Aktivkohle konnte Wu et al. (2017) die Produktion von Itaconsäure auf einem Weizenkleihydrolysat von 8 g/L auf 34,2 g/L mit einer Ausbeute von 0,41 (w/w) anheben, indem die Konzentration von Furfural von 0,1 g/L auf 0,075 g/L reduziert wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden generell geringe Furfuralkonzentrationen als Inhibitor des Wachstums von *A. terreus* und somit der Produktion von Itaconsäure ausgemacht. Der erzielte Titer von 34,6 g/L ist im Vergleich zu 27,7 g/L Itaconsäure auf aufgereinigtem Weizenkaffhydrolysat aufgrund der höheren Zuckerkonzentration im Weizenkleihydrolysat leicht erhöht. Das Hydrolysat von Wu et al. (2017) enthielt mit 60 g/L Xylose und 40 g/L Glucose etwa 15 % mehr Zucker als das eingesetzte Weizenkaffhydrolysat dieser Arbeit. Der höhere Zuckeranteil entspricht in etwa der Titererhöhung von 20 %. Zudem wurden die Versuche von Wu et al. (2017) unter optimierten und kontrollierten Bedingungen in einem Rührkesselre-

aktor durchgeführt. Insgesamt sind die Ausbeuten der Kultivierung von Wu et al. (2017) und dieser Arbeit der beiden Wildtypstämme DSM 23081 und CICC40205 nach einer Aufreinigung mittels Kationentauscher bzw. Aktivkohle mit 0,41 (w/w) vergleichbar. Für eine weitere Steigerung des Titers und der Ausbeute mutierte Wu et al. (2017) den Stamm CICC40205 und erhielt so 49,6 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,55 (w/w).

Insgesamt betrachtet liegen die Produktivitäten, Titer und Ausbeuten von *A. terreus* DSM 23081 im Vergleich zur Literatur im oberen Bereich. Jedoch ist es schwierig, die unterschiedlichen Prozesse bezüglich eingesetzter Biomasse, verwendeter Vorbehandlung, Zuckerzusammensetzung der Hydrolysate und zugesetzten Medienbestandteilen, sowie den Kultivierungsmaßstab zu vergleichen. Auffällig ist aber, dass in der Literatur entweder eine Aufreinigung der Hydrolysate durchgeführt werden muss, oder eine Mutagenese des Stammes, um die Robustheit zu erhöhen. In dieser Arbeit ist es gelungen, mit einem Wildtypstamm ohne Verwendung von Aktivkohle oder Ionentauscher Itaconsäure in einem annehmbaren Konzentrationsbereich von 23,3 g/L mit einer Ausbeute von 0,27 (w/w) zu produzieren. Beide Prozessgrößen konnten zusätzlich durch eine optionale Entfernung von Kationen auf 27,7 g/L und 0,41 (w/w) gesteigert werden. Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich dabei von der aufgeführten Literatur grundlegend in der Herangehensweise. In dieser Arbeit wurde die Bildung von Inhibitoren vermieden, um so eine komplexe Aufreinigung zu umgehen. In der Literatur werden den Inhibitoren bei der Herstellung des Hydrolysats erst keine Bedeutung eingeräumt. Anschließend werden die Inhibitoren aufwendig entfernt oder robustere *A. terreus*-Mutanten erzeugt. Die Herangehensweise auf Basis von Inhibitorversuchen wurde so in der Literatur noch nicht beschrieben und kann als Grundlage für die Itaconsäureproduktion auf weiteren nachwachsenden und komplexen Polysacchariden dienen.

Tabelle 4.10 – Literaturvergleich von Kultivierungen mit *A. terreus* mit Hydrolysaten auf Basis von Lignocellulose.

<i>A. terreus</i>	Hydrolysat	Aufreinigung	System	IA [g/L]	$Y_{P/S}$ [w/w]	Referenz
K26	Sicheltanne	Neutralisation, Elektrodialyse, Flüssig-Flüssig Extraktion, Anionentauscher	k.A.	39,9	0,53	Kobayashi (1978)
NRRL 1960	Birkenholz	Waschschritt (0,5 M NaOH, 50 °C), Aktivkohle, Anionentauscher, Kationentauscher	SK	7,2	0,3	Tippkötter et al. (2014)
CICC2452	Maisstroh	Neutralisation H ₂ O	SK	0,54		Li et al. (2016)
CICC2452 Mutante AT-90	Maisstroh	Neutralisation H ₂ O	SK	19,3	0,36	Li et al. (2016)
ATCC 10020	Reishülsen	Neutralisation CaO(s)	SK	< 2	-	Pedroso et al. (2017)
CICC40205	Weizenkleie	Neutralisation Ca(OH) ₂	STR	8	-	Wu et al. (2017)
CICC40205	Weizenkleie	Neutralisation Ca(OH) ₂ , Aktivkohle	STR	34,2	0,41	Wu et al. (2017)
CICC40205 Mutante	Weizenkleie	Neutralisation Ca(OH) ₂ , Aktivkohle	STR	49,6	0,55	Wu et al. (2017)
DSM 23081	Weizenkaff	Neutralisation H ₂ O	SK	23,3	0,27	vorliegende Arbeit
DSM 23081	Weizenkaff	Neutralisation H ₂ O, Kationentauscher	SK	27,7	0,41	vorliegende Arbeit

SK - Schüttelkolben, STR - Rührreaktor

4.3 Itaconsäureproduktion auf Basis von Glucose mit *A. terreus*

Industriell wird der Stamm *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion verwendet und zeigt die besten Ergebnisse in Titer, Ausbeute und Produktivität mit Glucose (vgl. Kapitel 4.2.6, S. 101). Dieser Teil der Arbeit baut auf Dissertationen von Kuenz (2008) und Hevekerl (2016) auf. Kuenz (2008) konnte eine reproduzierbare Morphologie mit *A. terreus* mit einem Pelletdurchmesser von 0,1 mm erzielen. Im Batch konnte durch diese gleichmäßigen und fransigen Pellets ein Titer von bis zu 91 g/L Itaconsäure in einem 1,5 L-Rührreaktor ohne pH-Regelung erzielt werden. In einem Fed-Batch steigerte Hevekerl (2016) den Titer auf 129 g/L Itaconsäure im selben Reaktorsystem durch eine Medienoptimierung, eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur, den Einsatz von submersen Sporen und die Verwendung einer pH-Kontrolle.

4.3.1 Referenzkultivierungen im 1,5 L-Rührreaktor

Zu Beginn wurden die Kultivierungen ohne und mit pH-Kontrolle nach Kuenz (2008) und Hevekerl (2016) reproduziert. Dazu wurden die Optimierungsansätze von Hevekerl (2016) genutzt, um beide pH-Strategien miteinander vergleichen zu können. Es wurde bei 35 °C mit einer erhöhten Phosphatkonzentration 0,8 g/L KH_2PO_4 kultiviert und submerse Sporen verwendet (Hevekerl et al., 2014b).

4.3.1.1 Kultivierung ohne pH-Kontrolle

Bei der Kultivierung im 1,5 L-Rührreaktor ohne pH-Kontrolle zeigte sich ein typischer Verlauf der Itaconsäureproduktion (s. Abbildung 4.31). Die Sporen keimten innerhalb von 19 Stunden aus und es bildeten sich gleichmäßige und ausgefrante Pellets mit einem Durchmesser von 0,1 mm. Dabei fiel in dieser Phase der Sporenauskeimung der anfängliche pH-Wert von pH 3,1 auf pH 1,6 ab. Nach etwa einem Tag stieg der pH wieder auf pH 1,9 an und die Bildung von Itaconsäure konnte nachgewiesen werden. Der pH-Wert blieb während der gesamten Kultivierung konstant, wobei die BTM-Konzentration weiter anstieg und eine Konzentration von ca. 9 g/L nach ca. 2 Tagen erreichte. Somit ist das Wachstum von *A. terreus* und die Produktion von Itaconsäure nicht vollständig entkoppelt (Gyamerah, 1995b; Kuenz et al., 2012). Nach 3,1 Tagen konnten 80,8 g/L Itaconsäure nachgewiesen

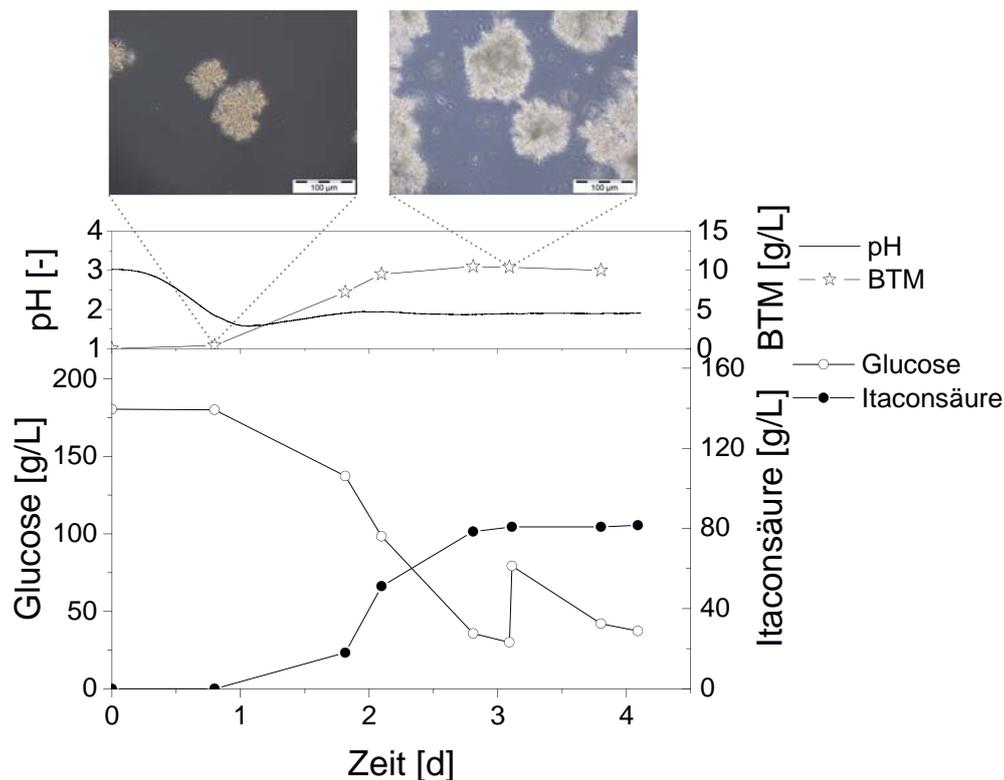


Abbildung 4.31 – Referenzkultivierung mit *A. terreus* ohne pH-Kontrolle in einem 1,5 L-Rührreaktor mit der sich einstellenden Morphologie (200-fach vergrößert) mit 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.

werden mit einer Ausbeute von 0,54 (w/w) und einer Produktivität von 1,1 g/(L·h). Eine weitere Zugabe von Glucose, um eine Kohlenstofflimitierung zu vermeiden, zeigte keine weitere Steigerung der Itaconsäurekonzentration. Der typische Verlauf der Itaconsäureproduktion, pH-Verlauf und BTM-Bildung waren vergleichbar mit den Kultivierungen von Kuenz (2008), die einen vergleichbaren Titer von 83,1 g/L Itaconsäure nach 8 Tagen mit einer Ausbeute von 0,53 (w/w) erzielte. Eine Ausnahme ist die Produktivität von 0,43 g/(L·h), welche um das 2,5-fache geringer war. Die gesteigerte Produktivität dieser Arbeit war zurückzuführen auf eine erhöhte Kaliumdihydrogenatphosphatkonzentration von 0,1 g/L auf 0,8 g/L im Medium und eine daraus resultierende gesteigerte Bildung von BTM von 7 g/L auf 9 g/L. Zusätzlich keimten die verwendeten submersen Sporen verglichen mit Oberflächensporen, die von Kuenz (2008) verwendet wurden, deutlich schneller aus (Hevekerl, 2016). Auch die Erhöhung von 33 °C auf 35 °C hatte einen positiven Einfluss auf den Metabolismus und lässt die Produktivität ansteigen (Hevekerl, 2016).

4.3.1.2 Kultivierung mit pH-Kontrolle

Die Kultivierung im 1,5 L-Rührreaktor nach Hevekerl (2016) ist in Abbildung 4.32 dargestellt. Die Sporen keimten nach ca. 20 h aus und der pH-Wert sank von pH 3,1 auf pH 1,7 ab. Es bildeten sich gleichmäßige fransige Pellets und nach einem Tag konnte die Bildung von Itaconsäure nachgewiesen werden. Nach zwei Tagen wurde der pH-Wert mit einer 6,25 % (v/v) Ammoniaklösung auf pH 3 angehoben und geregelt. Die Itaconsäurekonzentration erreichte mit 130,8 g/L ihr Maximum nach 9 Tagen bei einer Ausbeute von 0,58 (w/w). Die Pellets waren gleichmäßig mit einem Durchmesser von 80 μm und zeigten einen ausgefransten Rand. Insgesamt stieg die BTM auf 17 g/L an und war im Vergleich zur Kultivierung ohne pH-Kontrolle fast doppelt so hoch. So erhöhte sich die BTM-Konzentration im Vergleich zur Kultivierung ohne pH-Kontrolle in der Produktionsphase um ca. 70 %, was vermuten lässt, dass der pH-Wert einen starken Einfluss auf die BTM-Bildung hat. Um eine C-Limitierung zu vermeiden, wurde der Kultivierung

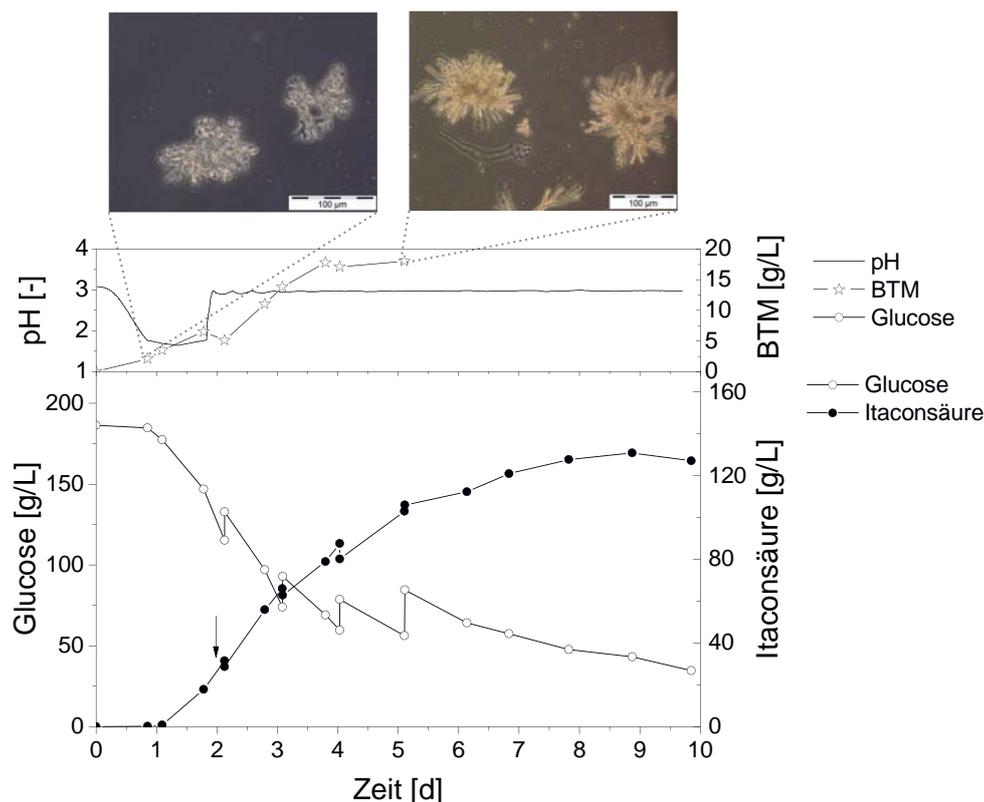


Abbildung 4.32 – Referenzkultivierung mit *A. terreus* mit pH-Kontrolle nach 2 Tagen auf pH 3 mit einer 6,25 % Ammoniaklösung in einem 1,5 L-Rührreaktor der sich einstellenden Morphologie (200-fach vergrößert) mit 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.

in regelmäßigen Abständen Glucose zugeführt. Der erzielte Titer, die Ausbeute und die Konzentration der BTM entsprechen den Ergebnissen von Hevekerl (2016). Durch die Regelung des pH-Wertes in der Produktionsphase konnte die Itaconsäurekonzentration um 62 % gesteigert werden im Vergleich zur Kultivierung ohne pH-Regelung. Hevekerl (2016) vermutet, dass die Steigerung der Itaconsäurekonzentration nicht auf die erhöhte Bildung von BTM zurückzuführen ist, sondern auf eine erhöhte maximale Löslichkeit der Itaconsäure im Medium durch den angehobenen pH-Wert. Jedoch ist dies lediglich eine Vermutung, die durch eine nähere Betrachtung des Einflusses des pH-Wertes auf die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde. Diese Kultivierung dient als Ausgangs- und Standardkultivierung für alle weiteren durchgeführten Fermentationen im 1,5 L-Maßstab.

4.3.2 Korrekturmittel

Für die pH-Korrektur wurden von Hevekerl et al. (2014b) unterschiedliche Basen getestet, dabei zeigte die Verwendung einer 6,25 % Ammoniaklösung im Vergleich zu Kalium- oder Natriumhydroxid die höchste Produktivität und gleichzeitig die höchsten Titer an Itaconsäure. Im Laufe dieser Arbeit wurden Ammoniaklösungen von differierender Reinheit für die pH-Kontrolle verwendet, miteinander verglichen und mittels ICP-OES analysiert.

In Standardkultivierungen wurde der pH-Wert nach 1,8 Tagen jeweils mit den Ammoniaklösungen von Fluka (für Ultraspurenanalyse), Carl-Roth (Rotipur) oder Sigma-Aldrich (ACS Reagenz) auf pH 3 angehoben und gehalten (s. Abbildung 4.33). Nach der Anhebung des pH-Wertes mit Ammoniaklösung von Sigma-Aldrich verringerte sich die Produktivität von 1,14 g/(L·h) auf 0,86 g/(L·h). Auch zeigte sich während der pH-Korrektur die Bildung von Sporen und *A. terreus* wuchs als locker verzweigtes Mycel, wobei ein Titer von 35,2 g/L erreicht wurde. Die Ausbeute lag bei 0,34 (w/w). Bei der Verwendung der Ammoniaklösung von Carl-Roth blieb die Produktivität von 0,96 g/(L·h) nach der pH-Anhebung nahezu gleich mit 0,92 g/(L·h). Nach 2,7 Tagen betrug die Ausbeute 0,43 (w/w) bei einer Itaconsäurekonzentration von 40,2 g/L. Die anfänglichen Pellets waren sehr locker und hatten weitverzweigte Hyphenausläufer. Nur durch die Verwendung einer Ammoniaklösung von Fluka für den Ultraspurenbereich wurde die Bildung von lockeren Pellets mit ausgefranstem Rand und einem Durchmesser von 80–100 µm nachgewiesen. Die Itaconsäureproduktivität stieg nach der pH-

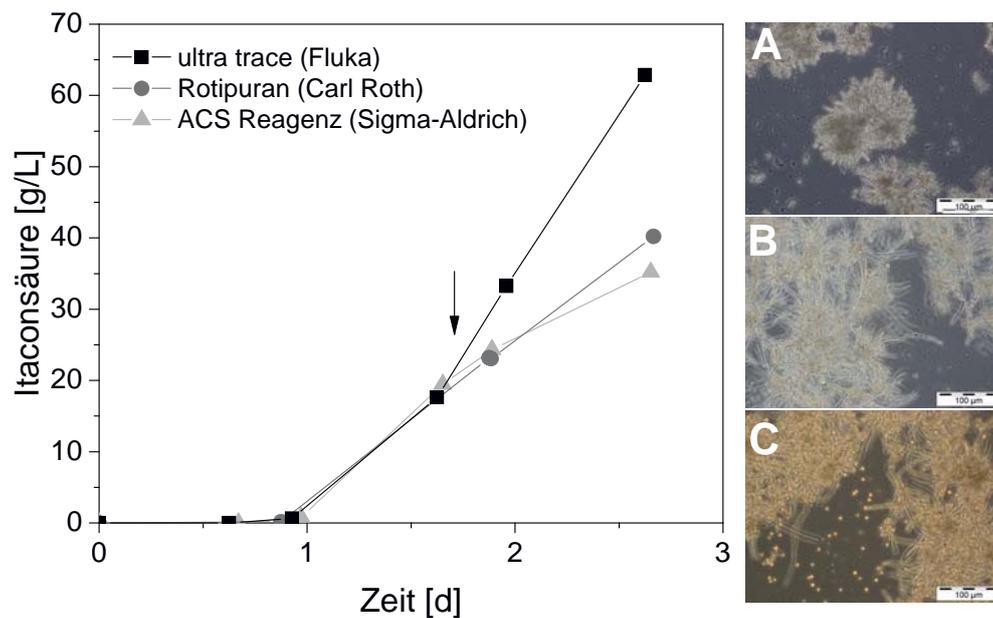


Abbildung 4.33 – Einfluss unterschiedlicher 6,25 % Ammoniaklösungen als Korrekturmittel für die pH-Korrektur auf die Itaconsäureproduktion und Morphologie. 1,5 L-Rührreaktor mit einem Start-pH von pH 3,1 und pH-Kontrolle nach 1,8 Tagen auf pH 3, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Der Pfeil markiert den Startzeitpunkt der pH-Kontrolle. Morphologie von *A. terreus* nach 2,7 Tagen A - Ammoniaklösung mit der Reinheit ultra trace von Fluka, B - Ammoniaklösung mit der Reinheit Rotipuran p.a. von Carl Roth und C - Ammoniaklösung mit der Reinheit ACS Reagenz von Sigma-Aldrich, jeweils 200-fach vergrößert.

Veränderung von 1,03 g/(L·h) auf 1,85 g/(L·h) an. Nach 2,7 Tagen betrug die Itaconsäurekonzentration 62,9 g/L mit einer Ausbeute von 0,59 (w/w).

Die Analyseergebnisse der einzelnen Ammoniaklösungen können dem Anhang entnommen werden (Kapitel B.3, S. 164). Die Lösungen von Carl-Roth und Fluka zeigten kaum Unterschiede im Auftreten und in der Konzentration der analysierten Spurenelemente. Die höchste enthaltene Konzentration zeigte Kalium mit ca. 3 mg/L, alle weiteren Elemente waren nicht auffällig. Im Gegensatz dazu zeigten sich für die Ammoniaklösung von Sigma-Aldrich hohe Konzentrationen von Aluminium (0,78 mg/L), Bor (1,92 mg/L), Natrium (79 mg/L) und Nickel (0,01 mg/L). Die Konzentration von Mangan lag in allen drei Lösungen unter der Nachweisgrenze von 0,4 µg/L. Aluminium-, Bor-, Mangan-, und weitere Ionen sind nicht förderlich für die Itaconsäurebildung mit *A. terreus*, zusätzlich wird durch diese die Morphologie verändert (Lockwood and Reeves, 1946; Kobayashi, 1978; Gyamerah, 1995a; Karaffa et al., 2015; Hevekerl, 2016). Somit waren die Sporulation und die veränderte Morphologie von anfänglich lockeren Pellets ver-

mutlich auf Verunreinigungen der Ammoniaklösungen zurückzuführen. Da sich die Ammoniaklösungen von Carl-Roth und Fluka nicht deutlich in Verunreinigungen und Konzentrationen unterschieden war davon auszugehen, dass die störenden Komponenten mit der verwendeten Methode bzw. den verwendeten Standards nicht erfasst werden konnten.

Aus der veränderten Morphologie resultiert die Stagnation oder auch Abnahme der Produktivität und Ausbeute. Gyamerah (1995a) zeigt auf, dass die optimale Ausbeute von 0,55–0,59 (w/w) auf Glucose mit gleichmäßigen Pellets mit einem Durchmesser von 100–500 μm erzielt wird, was den Ergebnissen bei der Verwendung der Ammoniaklösung von Fluka entsprach. Bildet *A. terreus* dagegen große, lose Mycelpellets aus, wie im Fall der Ammoniaklösung von Carl-Roth, sinkt die Ausbeute auf 0,45–0,51 (w/w) (Gyamerah, 1995a). Die stark unterschiedlichen Ergebnisse unter der Verwendung verschiedener Ammoniaklösungen machen deutlich, wie empfindlich der Pilz auf Ionen reagiert, sich dadurch die Morphologie verändert und somit die Ausbeute und Produktivität stark absinken. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit nur die Ammoniaklösung von Fluka für die weiteren Kultivierungen mit *A. terreus* verwendet, um das Eintragen von minimalen Verunreinigungen durch die Lösungen ausschließen zu können.

4.3.3 Startpunkt der pH-Kontrolle

Zu Beginn der weiteren Optimierung für die Kultivierung im 1,5 L-Reaktor mit pH-Kontrolle wurde getestet, ob es einen optimalen Startzeitpunkt für die Aktivierung der pH-Kontrolle gibt.

Dazu wurde die pH-Kontrolle mit 6,25 % (v/v) Ammoniaklösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Abhängigkeit der bereits produzierten Itaconsäure gestartet (s. Abbildung 4.34). Der pH-Wert wurde nach 1,1 Tagen, 1,8 Tagen, 2,2 Tagen und 2,9 Tagen auf pH 3 angehoben und geregelt. Der Start-pH sank in den ersten 24 Stunden bei allen Kultivierungen von pH 3,1 in den Bereich von pH 1,6–1,8 ab. Der Startzeitpunkt der pH-Regelung nach 1,1 Tagen entsprach dem Produktionsbeginn der Itaconsäure. Zu diesem Zeitpunkt waren die Sporen ausgekeimt und es konnten 0,1 g/L Itaconsäure nachgewiesen werden. Diese frühe Anhebung des pH-Wertes hatte einen negativen Einfluss auf die Itaconsäureproduktion. Es wurden lediglich 23,8 g/L Itaconsäure innerhalb von 5 Tagen gebildet. Bei der Aktivierung der pH-Kontrolle nach 1,8 Tagen oder zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich eine konstante maximale Produktivität von

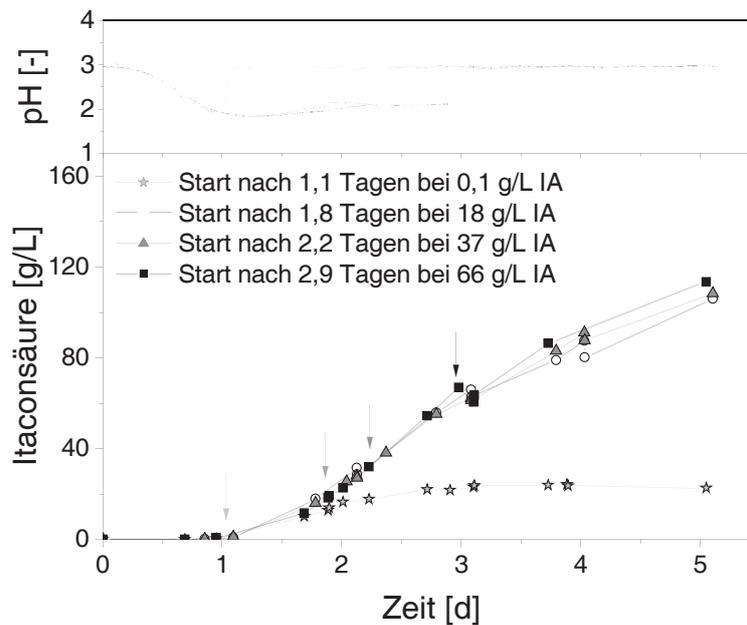


Abbildung 4.34 – Einfluss des Startzeitpunkts der pH-Kontrolle auf die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* auf pH 3 mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) in einem 1,5 L-Rührreaktor mit einem Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Die Pfeile markieren den Startzeitpunkt der pH-Kontrolle.

1,53 ± 0,16 g/(L·h) und nach 5 Tagen ein Titer von 108 ± 5 g/L Itaconsäure. Unabhängig vom Startzeitpunkt der pH-Kontrolle wurde eine Biotrockenmasse von 17,1 ± 0,8 g/L erreicht. Die Pellets hatten einen Durchmesser von 80 µm und waren locker und fransig. Da sich weder ein Unterschied in Produktivität, Titer oder BTM-Konzentration zwischen den Kultivierungen mit einer pH-Änderung zwischen 1,8 und 2,9 Tagen zeigte, wurden die Untersuchungen nach 5 Tagen beendet.

Für die Itaconsäureproduktion beschreiben Larsen and Eimhjellen (1955), dass die Zellen bei niedrigen pH-Werten wachsen müssen, um relevante Enzymsysteme für die Itaconsäureproduktion zu bilden. Beim Start der pH-Kontrolle nach 1,1 Tagen war der pH-Wert zwar auf pH 1,8 abgesunken, aufgrund der sehr geringen Produktion von 23,8 g/L war allerdings davon auszugehen, dass der Zeitraum des Wachstums bei einem niedrigen pH-Wert nicht ausreichte. Auch Hevekerl (2016) beschreibt, dass eine pH-Kontrolle von Kultivierungsbeginn an einen negativen Einfluss auf die Itaconsäureproduktion hat. Somit hat der pH-Wert nicht nur einen Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration (vgl. Kapitel 4.3.1.2, S. 109), sondern auch auf die Itaconsäureproduktion und könnte so ein Auslöser für die Überproduktion der Itaconsäure sein. Bei Beginn der pH-Kontrolle ab Tag 1,8 oder

18 g/L Itaconsäure war zwischen den einzelnen Kultivierungen kein Unterschied erkennbar. Aufgrund von gleicher Morphologie und BTM-Konzentration zeigten sich weder Unterschiede in der Ausbeute, Produktivität oder im Endtiter. Somit kann daraus geschlossen werden, dass der Startzeitpunkt der pH-Kontrolle nicht relevant für hohe Endkonzentrationen ist, sondern der Organismus sollte sich in der fortgeschrittenen Produktionsphase befinden, die ca. ab einer Itaconsäurekonzentration von ~ 20 g/L liegt. Auch in der Literatur werden unterschiedliche Itaconsäurekonzentrationen für den Start von pH-Änderungen beschrieben, die jedoch alle in der fortgeschrittenen Produktionsphase liegen. So beschreiben Batti and Schweiger (1963) die pH-Kontrolle ab einer erzielten Itaconsäurekonzentration im Bereich von 25–45 g/L als optimal für eine Steigerung des Endtiters. Zusätzlich wird durch eine Anhebung des pH-Wertes im Konzentrationsbereich von 46–50 g/L Itaconsäure die Konzentration der Nebenprodukte reduziert (Batti, 1964). Auch Nubel and Ratajak (1962) ermittelten einen positiven Einfluss auf die Kultivierung durch eine einmalige pH-Anhebung bei einer Itaconsäurekonzentration von 40 g/L.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keinen optimalen Startzeitpunkt für die pH-Kontrolle gibt. Der Startzeitpunkt sollte lediglich in der fortgeschrittenen Produktionsphase liegen, was bei einer Itaconsäurekonzentration von ~ 20 g/L zutrifft. Aus diesem Grund ist ein Start zu einem exaktem Zeitpunkt, wie beispielsweise nach 2 Tagen (Hevekerl, 2016), nicht notwendig und kann frei im Konzentrationsbereich von 20–70 g/L gewählt werden.

4.3.4 Einfluss des pH-Wertes

Der Einfluss des pH-Wertes in der Produktionsphase wurde in einem Fed-Batch mit Glucose untersucht, indem der pH-Wert nach 2 Tagen auf pH-Werte im Bereich von pH 3,0–3,6 angehoben und geregelt wurde. Die Endkonzentration, Produktivität, sowie die Ausbeute und die BTM-Konzentration sind in Abbildung 4.35 vergleichend dargestellt.

Der pH-Wert von pH 3 resultierte in einer Endkonzentration von 129 g/L mit einer Produktivität von 0,61 g/(L·h) und einer Ausbeute von 0,57 (w/w). Insgesamt wurden 17 g/L Biotrockenmasse gebildet. Bei einer pH-Kontrolle auf pH 3,2 stieg die Endkonzentration auf 138 g/L Itaconsäure und die Produktivität auf 0,82 g/(L·h) an. Die Ausbeute lag bei 0,56 (w/w) und nahm im Vergleich zur Kultivierung mit pH 3,0 leicht ab. Obwohl die BTM-Konzentration gleich blieb, nahm der Durchmesser von 80–100 μm auf 120–140 μm der Pellets zu und die

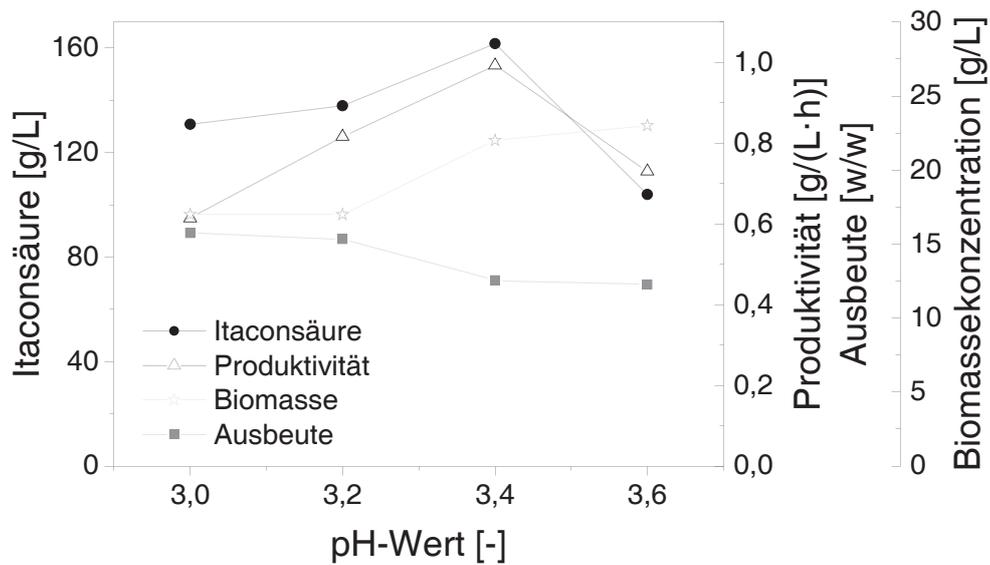


Abbildung 4.35 – Einfluss der pH-Kontrolle in der Produktionsphase von *A. terreus* auf Endtiter, Produktivität, Ausbeute und BTM-Konzentration. Der pH-Wert wurde nach 2 Tagen mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) in einem 1,5 L-Rührreaktor auf den jeweiligen pH-Wert angehoben und geregelt. Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, Fed-Batch mit Glucose, 450 rpm und 35 °C.

Pellets wurden mit zunehmendem pH-Wert kompakter. Beide Kultivierungen zeigten eine typische hellgelbe Färbung. Bei der Anhebung des pH-Wertes auf pH 3,6 verfärbte sich die Kultivierung rot-bräunlich und die BTM-Konzentration stieg auf 23 g/L an. Der Durchmesser der kompakten Pellets lag bei durchschnittlich 190 μm und die Endkonzentration betrug 104 g/L Itaconsäure. Die Gesamtproduktivität sank auf 0,73 g/(L·h) und die Ausbeute fiel auf 0,45 (w/w). Die höchste Itaconsäurekonzentration von 162 g/L wurde mit der Kontrolle des pH-Wertes in der Produktionsphase auf pH 3,4 erzielt. Dabei betrug die Produktivität 0,99 g/(L·h) und die Ausbeute 0,46 (w/w). Die Konzentration der gebildeten BTM lag mit 22 g/L leicht unter der Konzentration von der Kultivierung bei pH 3,6. Die Pellets erreichten einen Durchmesser von 160 μm und die Kulturbrühe war über die gesamte Fermentation gelblich gefärbt.

Die Abnahme der Ausbeute mit zunehmendem pH-Wert korreliert mit der Zunahme der BTM und des Pelletdurchmessers. Zusätzlich wurden die Pellets mit zunehmendem pH-Wert kompakter, wobei kompaktere Pellets eine geringere Ausbeute aufweisen als lockere Pellets (Gyamerah, 1995a). Aufgrund der Zunahme der BTM, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Glucose nicht mehr für die Itaconsäurebildung, sondern für die Bildung wichtiger Metabolite für

die Pilzbiomasse-Bildung genutzt wurde. Zusätzlich könnte durch die Zunahme der Pilzbiomasse im System die Durchmischung und daher eine Unterversorgung mit Sauerstoff für die Zellen entstanden sein. Eine solche Unterversorgung resultiert bei *A. terreus* in einer Unterversorgung der Zelle mit ATP, was den Metabolismus der Säureproduktion dauerhaft schädigt (Gyamerah, 1995b). Vermutlich war genau diese Unterversorgung und die kompakten Pellets der Grund, warum durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf pH 3,6 keine Steigerung des Endtiters erzielt werden konnte.

Es zeigte sich, dass eine pH-Anhebung in der Produktionsphase auf pH 3,4 optimal für die Kultivierung mit *A. terreus* ist. Durch die Anhebung des pH-Wertes um 0,4 Einheiten im Vergleich zur Referenz mit pH 3,0 konnte die Endkonzentration um 26 % erhöht werden. Jedoch ist weiterhin unbekannt, warum die Itaconsäurekonzentration zunahm. Eine mögliche Erklärung wäre nach Hevekerl et al. (2014b) die Zunahme der Löslichkeit der Itaconsäure und deren Salze im Medium aufgrund des sich verändernden Dissoziationsgrades. So steigt die maximale Löslichkeit im Medium von 166 g/L (35 °C, pH 3,0) auf 248 g/L (35 °C, pH 3,4) an. Auch die Verschiebung des Dissoziationsgrades selbst von der Säure hin zur einfachprotonierten Form könnte eine Möglichkeit sein, warum die Itaconsäurekonzentration anstieg, da bekannt ist, dass schwache Säuren fettlöslich sind, durch die Plasmamembran in das Cytosol diffundieren und so die Zelle schädigen können (Lambert and Stratford, 1999; Axe and Bailey, 1995). Diese Annahme wird in den Kapiteln 4.3.4.2 und 4.3.4.3 genauer untersucht.

4.3.4.1 Kultivierung mit pH-Kontrolle bei pH 3,4

Die Kultivierung mit der optimalen pH-Kontrolle nach 2 Tagen auf pH 3,4 ist in der Abbildung 4.36 im Detail dargestellt. Der pH-Wert sank innerhalb des ersten Tages von pH 3,1 auf pH 1,7 ab und die Sporen keimten aus. Mit Beginn der Itaconsäureproduktion nach 26 Stunden waren noch 396 mg/L Phosphat, 2,3 g/L Nitrat und 240 mg/L Ammonium im Medium enthalten. Der pH-Wert stieg leicht auf pH 2 an. Nach zwei Tagen wurde der pH-Wert auf pH 3,4 mit einer 6,25 % Ammoniaklösung von Fluka angehoben und die Ammoniumkonzentration im Medium nahm kontinuierlich bis auf 6,5 g/L zu. Die Itaconsäurekonzentration lag zu diesem Zeitpunkt bei 38 g/L. Die Konzentration der Itaconsäure stieg mit einer maximalen Produktionsrate von 1,78 g/(L·h) auf 162 g/L an. Die maximale BTM-Konzentration mit 22 g/L wurde nach drei Tagen erreicht, zu diesem

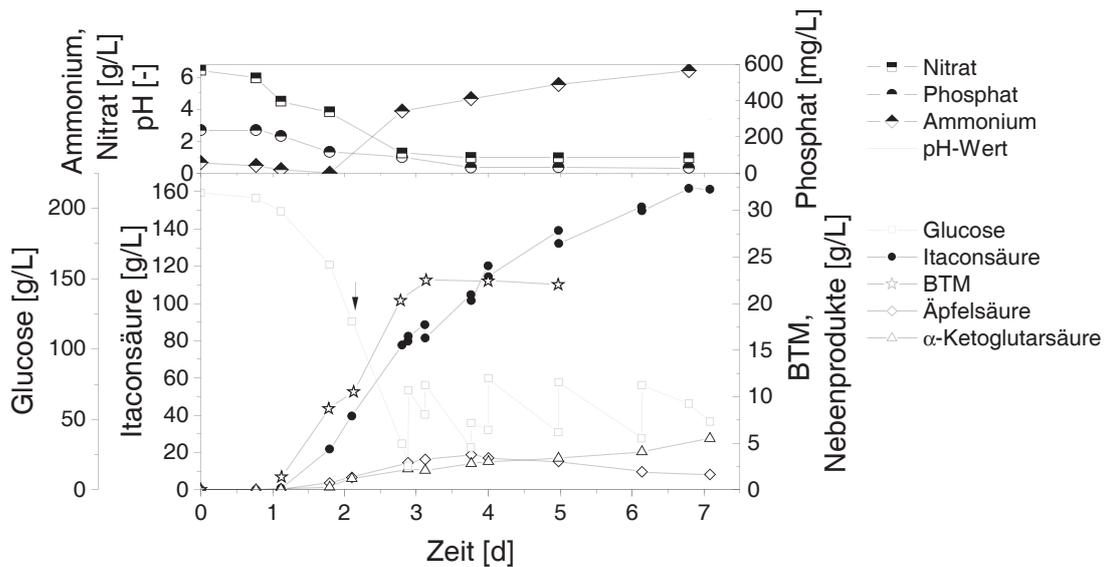


Abbildung 4.36 – Kultivierung von *A. terreus* in einem 1,5 L-Rührreaktor als Fed-Batch mit Glucose. Der pH-Wert wurde nach zwei Tagen mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3,4 angehoben und geregelt. Der Pfeil symbolisiert den Beginn der pH-Kontrolle. Start-pH von pH 3,1, 0,8 g/L KH_2PO_4 , $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C.

Zeitpunkt lagen noch 111 mg/L Phosphat und 1 g/L Nitrat im Medium vor. Als Nebenprodukte traten α -Ketoglutar säure und Äpfelsäure sowie in Spuren cis- und trans-Asconitsäure auf. Die Konzentration der Ketoglutar säure stieg kontinuierlich über die Dauer der Fermentation an, wogegen die Konzentration der Äpfelsäure ab Tag 4 wieder abnahm. Nach 7 Tagen wurden 5,5 g/L α -Ketoglutar säure und 1,6 g/L Äpfelsäure neben 162 g/L Itaconsäure im Medium nachgewiesen. So betrug der Anteil der Nebenprodukte am Ende der Kultivierung 4,3 %.

Es zeigte sich deutlich, dass die Produktion nicht vollständig vom Wachstum entkoppelt war, da die Konzentration der Biotrockenmasse innerhalb der ersten drei Tage parallel mit der Itaconsäurekonzentration anstieg und trotz gleichbleibender Biotrockenmassekonzentration ab Tag 3 die Itaconsäurekonzentration weiter anstieg. Vermutlich durch die Zugabe von Stickstoff in Form der Ammoniaklösung stieg die Konzentration der BTM deutlich auf 22 g/L an. Zu Beginn der Itaconsäureproduktion lag weder eine Phosphat- noch eine Stickstofflimitierung vor. Somit konnten diese Limitierungen nicht Auslöser für eine Itaconsäureüberproduktion sein, wie von Rychtera and Wase (1981), Riscaldati et al. (2000) und Willke and Vorlop (2001) beschrieben. Ein möglicher Auslöser könnte die pH-Absenkung in der Phase der Sporenauskeimung und frühen Produktionsphase sein, da bei einer pH-Anhebung zu Beginn der Itaconsäureproduktion keine hohen Endtiter

erzielt werden konnten (s. Kapitel 4.3.3, S. 112). Auch Hevekerl et al. (2014b) schloss eine Phosphat- oder Stickstofflimitierung aus. Somit ist der Auslöser der Überproduktion weiterhin unbekannt und sollte weiter untersucht werden. Es sollte dabei in Betracht gezogen werden, dass das Absenken des pH-Wertes in der frühen Produktionsphase (< 20 g/L Itaconsäure, bzw. in den ersten 48 Stunden) einen großen Einfluss hatte.

4.3.4.2 Dissoziationsgrad von Itaconsäure

Die pK_S -Werte für Itaconsäure bei Raumtemperatur liegen bei pH 3,84 und pH 5,55. Die Temperatur und Ionenstärke können diese Werte jedoch beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die pK_S -Werte für Itaconsäure im Fermentationsmedium bei 35 °C mittels Titration am Halbäquivalentspunkt bestimmt.

Das Gleichgewicht zwischen Itaconsäure (H_2IA) und der einfach-protonierten Form (HIA^-) lag bei pH 3,91. Der Halbäquivalentspunkt für HIA^- zur zweifach-protonierten Form (IA^{2-}) wurde bei pH 5,43 ermittelt. Somit wichen die ermittelten pK_S -Werte gering von den Literaturwerten, welche in reinem Wasser und bei Raumtemperatur bestimmt werden, ab. Aus diesem Grund wurden für die Berechnung der Dissoziationsgrade in Abhängigkeit des pH-Wertes die in dieser Arbeit bestimmten pK_S -Werte verwendet (s. Abbildung 4.37). Daraus ergab sich für die Fermentation ohne pH-Kontrolle, dass bei einem pH-Wert von pH 2,0 die

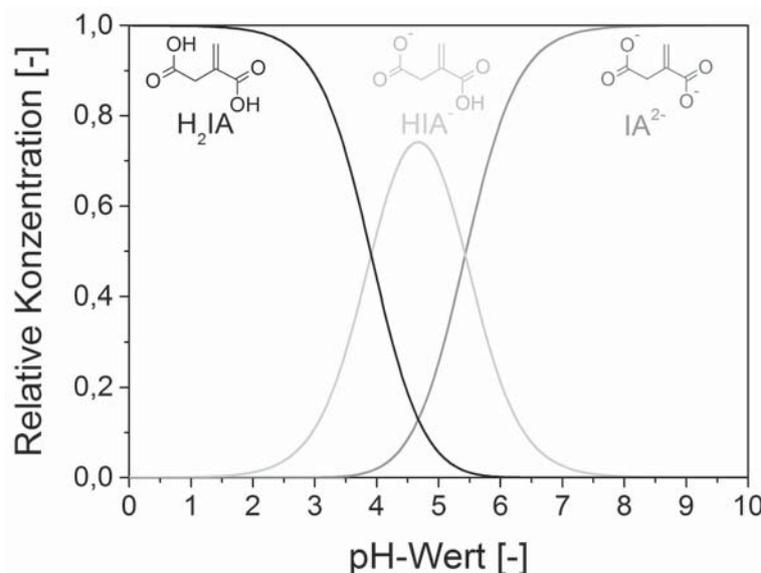


Abbildung 4.37 – Bestimmte relative Verteilung von Itaconsäure und Itaconaten als Funktion des pH-Wertes in der Fermentationsbrühe bei 35 °C.

Itaconsäure zu 98,8 % als Säure (H_2IA) vorlag und zu 1,2 % als HIA^- . Wurde der pH-Wert auf pH 3,0 angehoben, lagen 89 % der Itaconsäure als H_2IA vor und der Anteil von HIA^- stieg auf 11 %. Unter dem ermittelten optimalen pH-Wert von pH 3,4 (s. Kapitel 4.3.4, S. 114), nahm der Anteil von HIA^- auf 23,6 % weiter zu und der Anteil von H_2IA sank auf 76,2 %, zusätzlich trat mit einem sehr geringen Prozentsatz von 0,2 % IA^{2-} auf. Somit erhöhte sich nicht nur die Löslichkeit von Itaconsäure von 120 g/L (pH 2) auf 270 g/L (pH 3,4) in der Fermentationsbrühe (Hevekerl, 2016), sondern es verschob sich auch das relative Konzentrationsverhältnis mit steigendem pH-Wert von H_2IA zu HIA^- .

4.3.4.3 Bestimmung der Konzentrationen von Itaconsäure und Itaconaten in der Fermentationsbrühe

Für die Endkonzentrationen aus Kapitel 4.3.4 (S. 114) wurden im pH-Bereich von pH 3,0–3,4 mit den errechneten Dissoziationsanteilen (s. Kapitel 4.3.4.2) die Konzentrationen der einzelnen Dissoziationsformen berechnet. Zusätzlich wurden diese Ergebnisse mit Daten von Hevekerl et al. (2014b) für pH-Werte $< 3,0$ ergänzt. Die so berechneten Anteile an H_2IA zu HIA^- und die finale Itaconsäurekonzentration wurden in Abbildung 4.38 über dem jeweiligen herrschenden pH-Wert am Ende der Fermentation aufgetragen.

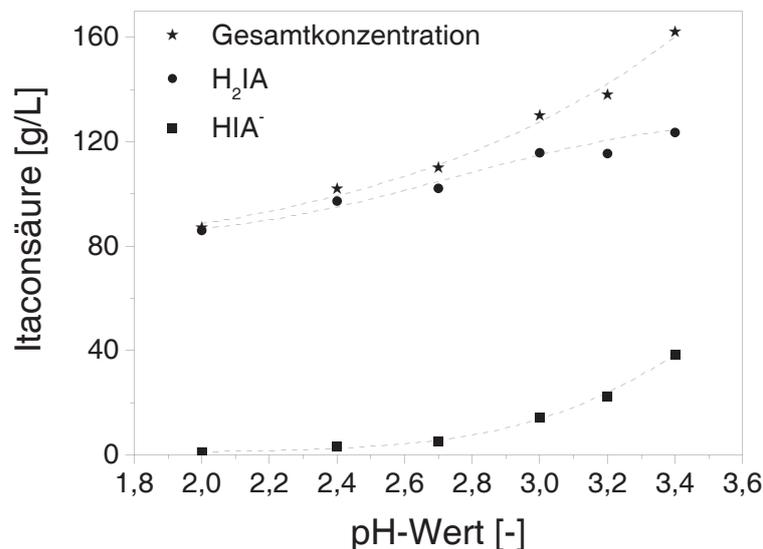


Abbildung 4.38 – Endtiter der Itaconsäure basierend auf den kalkulierten Anteilen von H_2IA und HIA^- . Die Daten dieser Arbeit wurden mit den Daten von Hevekerl et al. (2014b) für pH-Werte $< \text{pH } 3,0$ ergänzt.

Bei der Kultivierung ohne pH-Kontrolle mit einem finalen pH-Wert von pH 2 trat hauptsächlich H₂IA auf. Mit Erhöhung des pH-Wertes von pH 3,0 auf pH 3,4 in der Produktionsphase stieg der Titer von 129 g/L auf 162 g/L an. Dabei blieb die Konzentration von H₂IA in einem ähnlichen Bereich von 115–123 g/L. Lediglich die Konzentration von HIA⁻ stieg von 14 g/L bei pH 3,0 über 22 g/L (pH 3,2) auf 38 g/L bei pH 3,4 an. Im getesteten pH-Bereich trat IA²⁻ in nicht relevanten Konzentrationen auf (< 1 g/L). Insgesamt wurde deutlich, dass der Anteil an HIA⁻ anstieg, wobei die Konzentration von H₂IA nahezu gleich blieb. Die Zunahme der Konzentration an Itaconsäure könnte somit durch die Verschiebung von H₂IA zu HIA⁻ erklärt werden.

Als Konsequenz des erhöhten pH-Werts nahm nicht nur die Löslichkeit von Itaconsäure und deren Salzen in der Fermentationsbrühe zu, sondern es verschoben sich auch die Konzentrationen der einzelnen Dissoziationsformen von H₂IA über HIA⁻ zu IA²⁻. Anionen, wie HIA⁻ oder IA²⁻ können aufgrund ihrer Ladung nicht frei durch die Cytoplasmamembran diffundieren, verbleiben im Medium und schaden so der Zelle nicht. Die Säure dagegen diffundiert frei durch die Cytoplasmamembran. Besonders schwache Säuren sind dafür bekannt und dissoziieren in der Zelle, basierend auf dem intrazellulären pH-Wert. Das Proton säuert das Cytoplasma an und verursacht Stress oder ist wachstumsinhibierend für die Zelle. Durch die H⁺ATPase kann die Zelle dem Absinken des pH-Wertes entgegenwirken und Protonen aus der Zelle ins Medium pumpen, wobei Energie in Form von ATP benötigt wird (Lambert and Stratford, 1999; Viegas and Sa-Correia, 1991; Plumridge et al., 2004). Es kann davon ausgegangen werden, dass Itaconsäure in Form von H₂IA in die Zelle diffundiert und dort aufgrund des höheren intrazellulären pH-Wertes dissoziiert. *A. terreus* schleuste H⁺ vermutlich über H⁺ATPasen und das intrazelluläre Itaconat über Major Facilitator Superfamily Proteine (Mfs) aus der Zelle. Diese Mfs wurden von Li et al. (2011) nachgewiesen und nutzen Energie des elektrochemischen Gradientens der Zellmembran und benötigen kein ATP (Pao et al., 1998; Stergiopoulos et al., 2002). Bei den gemessenen Konzentrationen von 115–123 g/L H₂IA war *A. terreus* vielleicht nicht mehr in der Lage einen zusätzlichen Influx von H₂IA in die Zelle mittels Efflux von H⁺ entgegenzuwirken. Somit könnte der intrazelluläre pH-Wert abgesunken sein, da nicht genügend ATP zur Verfügung stand, um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten. Die ATP-Synthese basiert auf dem verfügbaren Sauerstoff innerhalb der Zelle und ist daher von dem verwendeten Bioreaktorsystem und von der Konzentration der gebildeten Pilzbiomasse abhängig. Aufgrund der sehr hohen BTM-Konzentration

von 17 bzw. 22 g/L, sowie den sehr kompakten Pellets ist es möglich, dass die Zellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurden, um einen höheren Influx von H_2IA in die Zelle auszugleichen.

Die Erhöhung auf pH 3,6 in der Produktionsphase zeigte keine Zunahme im Endtiter, obwohl der HIA^- sich weiter erhöhen würde. Der Grund dafür war eine veränderte Morphologie, hin zu größeren und kompakteren Pellets und einer weiteren Zunahme der BTM-Konzentration auf 23 g/L. Das Innere dieser deutlich größeren und kompakteren Pellets kann nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und führte daher zu geringen Ausbeuten und Titern (Gyamerah, 1995a).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Korrelation zwischen der Zunahme des Titers und der Zunahme von HIA^- bestand. Der pH-Wert hatte einen positiven Einfluss auf die Kultivierung, da sich der Dissoziationsgrad von H_2IA zu HIA^- verschob. Der finale Titer stieg um die HIA^- -Konzentration an, daher ist es möglich, dass *A. terreus* von einer höheren H_2IA Konzentration negativ beeinflusst wurde und HIA^- nicht schädlich für die Zelle war. Eine weitere Erhöhung des Titers bei höheren pH-Werten in der Produktionsphase ist denkbar, wenn es gelingt, dass die BTM-Konzentration nicht weiter ansteigt, *A. terreus* kleinere lockere Pellets ausbildet und zusätzlich die Zellen mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden.

4.3.5 Einfluss von Phosphat

Die Standardkultivierung mit 0,8 g/L KH_2PO_4 mit einer pH-Regelung in der Produktionsphase auf pH 3 erzielte eine Endkonzentration von 130 g/L Itaconsäure. Hevekerl et al. (2014b) beschreibt bei einer geringeren Phosphatkonzentration von 0,1 g/L KH_2PO_4 einen erhöhten Titer von 145 g/L Itaconsäure mit einer geringeren Produktivität von 1,23 g/(L·h). Vergleichend wurde mit einer pH-Regelung auf pH 3,4 mit 0,8 g/L und 0,1 g/L KH_2PO_4 kultiviert.

Beide Kultivierungen sind in Abbildung 4.39 dargestellt. Die Sporen der Kultivierung mit 0,1 g/L KH_2PO_4 keimten innerhalb der ersten 24 Stunden aus und Itaconsäure konnte nach 1,1 Tagen festgestellt werden, zu diesem Zeitpunkt waren noch 85 mg/L Phosphat im Medium enthalten. Der pH-Wert war auf pH 1,8 abgefallen. Nach 2,1 Tagen trat eine Phosphatlimitierung ein, wobei die Itaconsäurekonzentration 16 g/L betrug. Nach 2,8 Tagen und bei einer Konzentration von 35 g/L Itaconsäure wurde der pH-Wert von pH 1,9 auf pH 3,4 mit einer

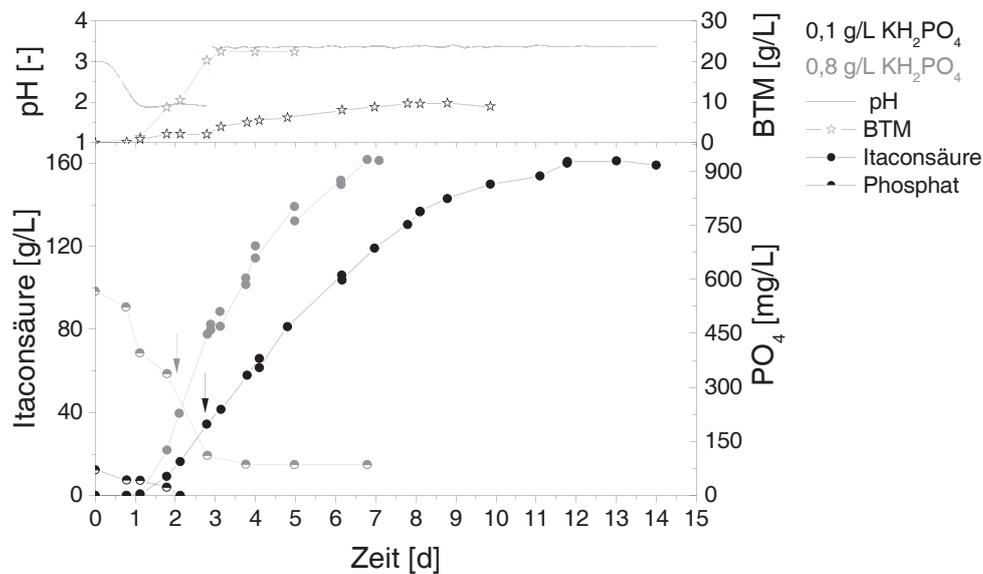


Abbildung 4.39 – Vergleich der Kultivierung von *A. terreus* mit 0,1 g/L und 0,8 g/L KH_2PO_4 in einem 1,5 L-Rührreaktor als Fed-Batch mit Glucose. Der pH-Wert wurde mit einer 6,25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3,4 angehoben und geregelt. Start-pH von pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, min. DO 25 %, 450 rpm und 35 °C. Die Pfeile symbolisieren den Beginn der pH-Kontrolle.

6,25 % Ammoniaklösung angehoben. Die Itaconsäurekonzentration stieg mit einer maximalen Produktivität von 1,05 g/(L·h) auf 160 g/L innerhalb von 11,8 Tagen an. Die Produktivität lag bei 0,58 g/(L·h) und die Ausbeute betrug 0,56 (w/w). Insgesamt hatte sich 10 g/L BTM gebildet und die lockeren gleichmäßigen Pellets hatten einen Durchmesser von 80 μm . Auffällig war, dass sich die Kulturbrühe ab Tag 7 mit fortschreitender Kultivierung von leicht gelblich in rot-violett umfärbte und sich Chlamydosporen bildeten.

Auch in der Kultivierung mit 0,8 g/L KH_2PO_4 keimten die Sporen nach 24 h aus und die Itaconsäurebildung startete nach 1,1 Tagen. Der pH-Wert sank innerhalb des ersten Tages auf pH 1,7 deutlich schneller ab als bei der Kultivierung mit 0,1 g/L KH_2PO_4 . Der pH wurde im Bereich von 35 g/L Itaconsäure nach 2 Tagen auf pH 3,4 angehoben. Es trat während der Kultivierung keine Phosphatlimitierung auf und die Konzentration der Biotrockenmasse stieg auf 22 g/L. Nach 6,8 Tagen wurde eine ähnliche Endkonzentration von 162 g/L Itaconsäure mit einer geringeren Ausbeute von 0,46 (w/w) erreicht. Die maximale Produktivität war fast doppelt so hoch mit 1,91 g/(L·h), verglichen mit der Kultivierung mit 0,1 g/L KH_2PO_4 . Die Pellets waren gleichmäßig und der Durchmesser war mit 160 μm doppelt so groß, wobei die Kulturbrühe leicht gelblich gefärbt war.

Unabhängig von der Phosphatkonzentration wurde ein Endtiter von 161 g/L \pm 1 g/L in beiden Kultivierungen erzielt, somit konnte das Ergebnis von Hevekerl et al. (2014b), dass die Phosphatkonzentration Einfluss auf die Endkonzentration hat, nicht bestätigt werden. Dagegen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Produktivität und Ausbeute. Aufgrund der geringeren Phosphatkonzentration von 0,1 g/L KH_2PO_4 trat eine Phosphatlimitierung nach 2,1 Tagen auf und es wurde mit 10 g/L 55 % weniger Biotrockenmasse gebildet als bei der Kultivierung mit 0,8 g/L KH_2PO_4 . Auf Basis der geringen Biotrockenmasse mit einem kleineren Durchmesser war die Produktivität um 44 % reduziert und die Ausbeute der Itaconsäure um 22 % erhöht. Kuenz (2008) und Hevekerl (2016) beschreiben beide die Zunahme von Biotrockenmasse durch eine Erhöhung der Phosphatkonzentration und somit die Steigerung der Produktivität. Die Zunahme des Pelletdurchmessers mit höherer Phosphatkonzentration wird von Gao et al. (2014) beschrieben, wobei auch die Biotrockenmasse zunimmt und die Ausbeute der Itaconsäure absinkt. Insgesamt wird durch die Phosphatkonzentration nicht der Endtiter beeinflusst, sondern nur die Biotrockenmassekonzentration. So kann die Kultivierung entweder hinsichtlich der Ausbeute oder der Produktivität durch eine Veränderung der Phosphatkonzentration optimiert werden.

Die geringere Biotrockenmassekonzentration mit einem Durchmesser von 80 μm bei pH 3,4 mit 0,1 g/L KH_2PO_4 könnte eine Möglichkeit sein, den pH-Wert in der Produktionsphase weiter auf $>$ pH 3,6 anzuheben. So könnte der Anteil der Itaconate weiter erhöht werden. Bei einer zukünftigen Verbesserung der Itaconsäureproduktion sollte der beschriebene Einfluss berücksichtigt werden. Die Anhebung des pH-Wertes auf pH 3,6 mit 0,8 g/L KH_2PO_4 resultierte in einer Zunahme an BTM und des Pelletdurchmessers, allerdings zu keiner Zunahme der Itaconsäurekonzentration (s. Kapitel 4.3.4, S. 114) und sollte mit geringeren Phosphatkonzentrationen wiederholt werden.

4.3.6 Einfluss von Mangan

Um hohe Ausbeuten und Endtiter bei der Citronen- oder Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus* erhalten zu können, sollte die Konzentration von Manganionen im Medium möglichst gering gehalten werden (Karaffa and Kubicek, 2003; Karaffa et al., 2015). Die Anwesenheit von Mangan wirkt sich auf die Bildung der Zellwand und somit auf die Morphologie des Pilzes aus (Kisser et al., 1980; Karaffa et al., 2015). Für *A. terreus* NREL 1960 liegt die Grenze bei 3 $\mu\text{g/L}$, höhere Konzentra-

tionen senken die Ausbeute und Titer an Itaconsäure (Karaffa et al., 2015). In Kapitel 4.2.4.5 (S. 95) wurde bereits festgestellt, dass unter anderem die Anwesenheit von Mangan im Hydrolysat die Morphologie von *A. terreus* DSM 23081 so verändern kann, dass diese sich negativ auf den Titer auswirkte. Das Standardmedium zur Kultivierung in dieser Arbeit wies eine Mangankonzentration von 1,7 µg/L auf. Durch die Zugabe von Glucose während der Kultivierung war davon auszugehen, dass weitere Manganionen in das Medium eingetragen werden könnten. Somit wäre es denkbar, dass die Konzentrationsgrenze von 3 µg/L überschritten und so die Ausbeute oder der Titer verringert wird. Ziel war es festzustellen, ob die Ausbeute oder der Endtiter durch eine Entfernung von Mangan aus der Glucose mittels Ionentauscher gesteigert werden könnte. Dazu wurde eine parallele Kultivierung von *A. terreus* im 1,5 L-Rührreaktor mit 0,1 g/L KH₂PO₄ und einer pH-Anhebung auf pH 3 durchgeführt, wobei für den Fed-Batch Standard-Glucose und gereinigte Glucose miteinander verglichen wurden.

Beide Kultivierungen wurden nach 11,8 Tagen beendet, da sich weder ein Unterschied in Morphologie, Titer, Ausbeute oder max. Produktivität zeigte (s. Tabelle 4.11). *A. terreus* wuchs in kleinen lockeren Pellets und der Titer lag durchschnittlich bei 145,1 ± 1,7 g/L. Auch die Ausbeute und maximale Produktivität wichen mit 3,8 % und 1,2 % nur geringfügig voneinander ab. Nach 11,8 Tagen lag die Mangankonzentration im Standardmedium bei 2,5 µg/L und im Medium mit gereinigter Glucose bei 1,7 µg/L. Da die Grenze von 3 µg/L in beiden Fällen nicht überschritten wurde, war der Kultivierungsverlauf nahezu identisch.

Somit lässt sich insgesamt sagen, dass bei den Reaktorkultivierungen dieser Arbeit die Beeinflussung durch Manganionen und somit Auswirkungen auf Titer und Ausbeute ausgeschlossen werden konnten. Es kam durch die Entfernung von Mangan und weiteren Ionen aus der Glucose zu keiner Steigerung der Endkonzentration oder Ausbeute.

4.3.7 Kultivierung im 15 L-Rührreaktor

Für eine potenzielle industrielle Umsetzung der Itaconsäureproduktion wurde der optimierte Prozess in den 15 L-Maßstab überführt. Dazu wurden vergleichbare Bedingungen wie im 1,5 L-Rührreaktor verwendet (Kuenz et al., 2012). Es wurde eine Kultivierung mit 0,8 g/L KH₂PO₄ durchgeführt und der pH-Wert nach 2,1 Tagen auf pH 3,4 angehoben. Die maximale Produktivität sank daraufhin von 2,1 g/(L·h) auf 0,6 g/(L·h) ab. Der Pelletdurchmesser war > 200 µm (s. Abbildung 4.40).

Tabelle 4.11 – Vergleich des Fed-Batchs mit Standard-Glucose und gereinigter Glucose von *A. terreus* im 1,5 L-Rührreaktor bei 35 °C, 450 rpm und 0,1 g/L KH_2PO_4 nach 11,8 Tagen.

	Standard Glucose	Gereinigte Glucose
IA [g/L]	143,4	146,8
Pr_{max} [g/(L·h)]	0,78	0,79
$Y_{P/S}$ [w/w]	0,54	0,52
Mangan [$\mu\text{g/L}$]	2,5	1,7

Aufgrund des Einbruchs der Produktivität, vermutlich basierend auf dem großen Pelletdurchmesser, war ein akzeptabler Titer mit einer hohen Produktivität nicht mehr zu erwarten und die Kultivierung wurde abgebrochen.

Um den Pelletdurchmesser zu reduzieren (vgl. Kapitel 4.3.5, S. 121) und das Absinken der Produktivität zu verhindern, wurde 0,1 g/L KH_2PO_4 eingesetzt und der pH-Wert lediglich auf pH 3 angehoben. Es wurde parallel zum 15 L-Reaktor auch eine Kultivierung in einem 1,5 L-Reaktor durchgeführt und in beiden Systemen eine 25 % Ammoniaklösung zur Anhebung und Regelung des pH-Wertes verwendet. Beide Kultivierungen sind in Abbildung 4.41 vergleichend dargestellt. Der pH-Wert beider Kultivierungen sank von pH 3,1 auf pH 1,8 ab und wurde nach 1,9 Tagen auf pH 3 angehoben. Die pH-Korrektur auf pH 3 erfolgte nach Bedarf, indem manuell die Ammoniaklösung hinzugefügt wurde. Die Sporen keimten in den ersten 24 Stunden aus und es bildeten sich verzweigte, lockere Pellets. Nach der Anhebung des pH-Wertes formten sich lange Mycelfäden an den Rändern der Pellets und *A. terreus* formte größtenteils Chlamydosporen (s. Abbildung 4.40).

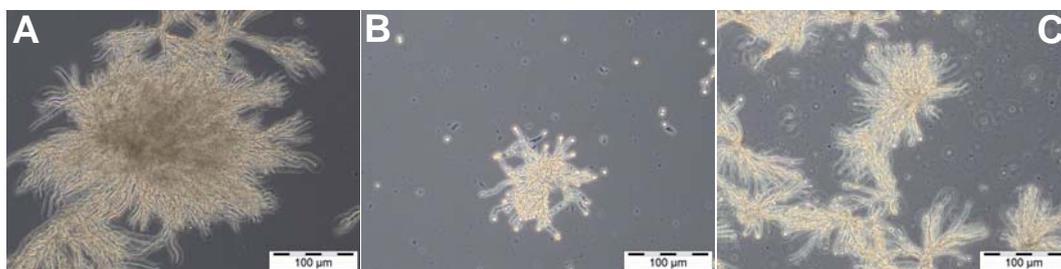


Abbildung 4.40 – Mikroskopische Aufnahmen der Kultivierungen von *A. terreus* bei 35 °C nach 3 Tagen mit 200-facher Vergrößerung. A - 15 L-Rührreaktor mit 0,8 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3,4, B - 1,5 L-Rührreaktor mit 0,1 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3, C - 15 L-Rührreaktor mit 0,1 g/L KH_2PO_4 und pH-Regelung mit pH 3. Start-pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, 1,5 L-Reaktor: min. DO 25 %, 450 rpm und 15 L-Reaktor: min. DO 20-25 %, 350 rpm.

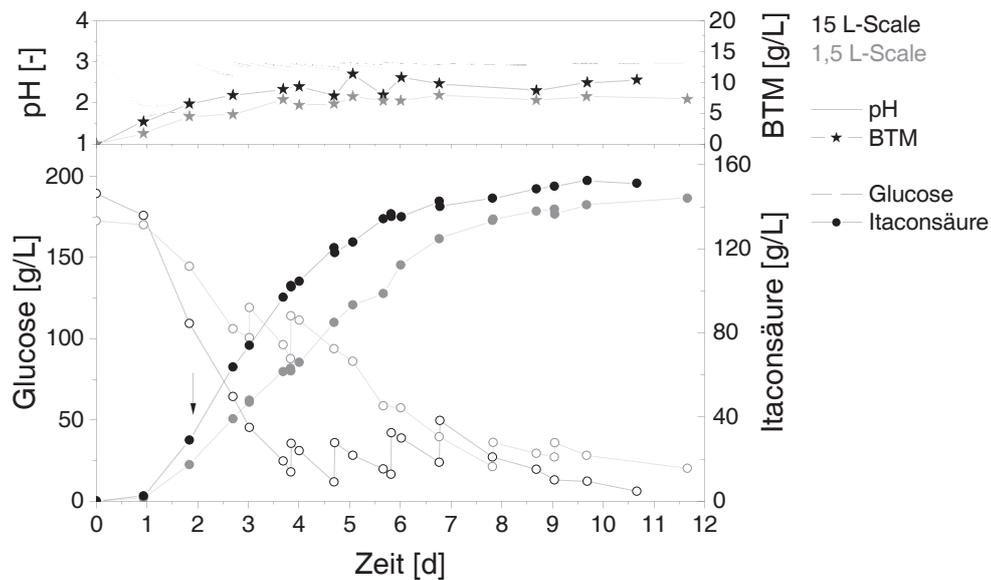


Abbildung 4.41 – Vergleich der Kultivierung in einem 15 L-Rührreaktor und einem 1,5 L-Rührreaktor von *A. terreus* mit 0,1 g/L KH_2PO_4 . Der pH-Wert wurde nach 2 Tagen mit einer 25 % Ammoniaklösung (Fluka, ultra trace) auf pH 3 angehoben und geregelt. Start-pH 3,1, $1 \cdot 10^6$ submerse Sporen/mL, 35 °C, 1,5 L-Reaktor: min. DO 25 %, 450 rpm und 15 L-Reaktor: min. DO 20-25 %, 350 rpm. Der Pfeil symbolisiert den Beginn der pH-Kontrolle.

Diese Sporen keimten im weiteren Fermentationsverlauf jedoch nicht aus. Im 15 L-Reaktor waren die Pellets augenscheinlich deutlich lockerer und zeigten mehr Mycelfäden. Nach ca. 4 Tagen waren die Pellets im stationären Wachstum und es hatte sich durchschnittlich 10 g/L BTM im 15 L-Reaktor und 8 g/L im 1,5 L-Maßstab gebildet. Nach 7 Tagen verfärbte sich die Fermentationsbrühe des 1,5 L-Reaktor von hellgelb zu rotbraun. Die Bildung von Itaconsäure konnte im 15 L-Reaktor nach 0,1 Tagen festgestellt werden und stieg mit einer maximalen Produktivität von 1,7 g/(L·h) an. Die maximale Konzentration von 152 g/L Itaconsäure wurde nach 9,7 Tagen erreicht. Die maximale Produktivität im 1,5 L-Reaktor war mit 1,1 g/(L·h) geringer und die Endkonzentration nach 11,7 Tagen betrug 144 g/L. Die Ausbeuten lagen bei 0,56 (w/w) im 15 L-Maßstab und 0,63 (w/w) im 1,5 L-Maßstab. In beiden Systemen wurde als Hauptnebenprodukt α -Ketoglutarsäure gebildet, nach 9,7 Tagen 3 g/L im 15 L-Maßstab und nach 11,7 Tagen 2,6 g/L im 1,5 L-Maßstab. Zusätzlich traten im 15 L-Reaktor Äpfelsäure, cis- und trans-Aconitsäure mit Konzentrationen $> 0,1$ g/L auf. 0,3 g/L trans-Aconitsäure und 0,1 g/L cis-Aconitsäure wurden am Ende der Kultivierung im 1,5 L-Reaktor nachgewiesen.

Insgesamt betrachtet war der Transfer der Itaconsäureproduktion mit pH-Regelung in der fortgeschrittenen Produktionsphase von einem 1,5 L-Reaktor in einen 15 L-Reaktor erfolgreich. Nach der Modifikation der Parameter KH_2PO_4 (Senkung von 0,8 g/L auf 0,1 g/L) und des pH-Wertes (Senkung der Regelung von pH 3,4 nur auf pH 3,0) zeigte sich eine vergleichbare Morphologie in beiden Systemen. Auffällig war, dass die maximale Produktivität im 15 L-Reaktor um 54 % verglichen mit dem 1,5 L-Reaktor höher lag, auch war ein Anstieg von etwa 6 % in der Endkonzentration sichtbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Sporen im 15 L-System schneller auskeimten und sich durchschnittlich 2 g/L mehr BTM im Vergleich zum 1,5 L-Maßstab gebildet hatte. Das schnellere Auskeimen und die höhere Biotrockenmassekonzentration basierte wahrscheinlich auf einem besseren Energieeintrag, Strömungsprofil oder Sauerstoffeintrag im 15 L-Reaktorsystem. Alle drei Gründe sind in der Literatur ausführlich für die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* untersucht worden (Park et al., 1993; Yahiro et al., 1997; Gyamerah, 1995b; Riscaldati et al., 2000; Shin et al., 2013). So zeigte Shin et al. (2013) in einem Scale-up mit konstantem K_{La} von einem 5 L- in einen 50 L-Rührreaktor, dass sich der Scherstress auf das Pellet im größeren Maßstab reduziert. Es wurden geringere Drehzahlen und Begasungsraten im 50 L-Reaktor benötigt, um die gleichen Sauerstoffübergangskoeffizienten zu erzielen. Auch Yahiro et al. (1997) bevorzugt eine Reaktorform mit geringerem Energieeintrag für die Itaconsäureproduktion, einen Airliftreaktor, um Titer und Ausbeute zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rührerdrehzahl von 450 rpm auf 350 rpm beim Scale-up abgesenkt, um den Energieeintrag der drei Rushton-Impeller im Vergleich zum hängenden Magnetrührstäbchen im 1,5 L-Reaktor anzupassen. Zusätzlich war *A. terreus* im 15 L-Reaktorsystem vermutlich besser mit Sauerstoff versorgt, sodass sich mehr Biotrockenmasse bildete und die Ausbeute der Itaconsäure absank. Auch Okabe et al. (1993) beschreibt die Zunahme von Pilzbiomasse bei höheren Begasungsraten. Denkbar ist, dass die unterschiedlichen Begasungssysteme Auswirkung auf die Itaconsäureproduktion hatten. Im 15 L-System wurde eine Ringbegasung verwendet, die sich unterhalb der Rührer befand (s. Abbildung 3.2, S. 28), so wurden die Blasen zerschlagen, dispergiert und im Reaktor verteilt. Im 1,5 L-Reaktor wurde eine Begasungsfritte verwendet (s. Abbildung 3.1, S. 26). Die Luft wurde durch die Membran mit Poren gepresst, sodass feine Blasen entstanden, die vom Rührer lediglich im Reaktor verteilt wurden.

Bezogen auf die ermittelten pK_S -Werte und Dissoziationsverteilung der Itaconsäure (s. Kapitel 4.3.4.3, S. 119), lag im 15 L-Reaktor nach 9,7 Tagen die Itaconsäure in 135 g/L H_2IA und 17 g/L HIA^- vor. Im 1,5 L-Reaktor waren es nach 11,7 Tagen 128 g/L H_2IA und 16 g/L HIA^- . Auch der leicht erhöhte Endtiter und die damit erhöhte H_2IA Konzentration könnte auf die bessere Sauerstoffversorgung im 15 L-Reaktor hindeuten. So könnte *A. terreus* in der Lage gewesen sein durch die bessere Versorgung mit Sauerstoff mehr ATP zu bilden und so das H^+ der einströmenden Itaconsäure (H_2IA) über H^+ -ATPasen aus der Zelle zu befördern.

Generell betrachtet war der Scale-up erfolgreich und die Itaconsäureproduktion mit einer pH-Anhebung in der fortgeschrittenen Produktionsphase könnte in den Pilotmaßstab überführt werden. Dabei ist besonderes auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung, geringen Scherstress und die daraus resultierende förderliche Morphologie zur Itaconsäureproduktion zu beachten.

4.3.8 Vergleich der Kultivierungen mit der Literatur

Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit sind die optimierten Kultivierungen dieser Arbeit in Tabelle 4.12 aufgelistet. Insgesamt zeigten die Kultivierungen mit einer höheren Phosphatkonzentration von 0,8 g/L KH_2PO_4 und einer pH-Regelung in der fortgeschrittenen Produktionsphase auf pH 3,4, die höchste max. Produktivität von 1,9 g/(L·h). Dagegen war die Ausbeute mit 0,46 (w/w) geringer als bei Kultivierungen mit 0,1 g/L KH_2PO_4 , da mehr BTM gebildet wurde. Unabhängig von der Phosphatkonzentration wurde ein Titer von ungefähr 160 g/L erzielt. Trotz des Einsatzes von 0,1 g/L KH_2PO_4 wurde eine hohe max. Produktivität von 1,7 g/(L·h) im 15 L-Reaktor erzielt. Vermutlich durch eine bessere Versorgung der Pellets mit Sauerstoff war die Produktivität um 55 % erhöht, verglichen mit dem 1,5 L-Reaktor. Auch konnte im 15 L-Maßstab wegen der geringen BTM-Produktion auf Basis der niedrigen Phosphatkonzentration eine hohe Ausbeute von 0,56 (w/w) erreicht werden.

In der Literatur (s. Tabelle 4.12, S. 129) wurde noch keine höhere Itaconsäurekonzentration als in dieser Arbeit beschrieben. Verglichen mit dem höchsten Titer von 129 g/L mit einer entsprechenden Produktivität von > 1 g/(L·h) und ähnlicher Kultivierungsstrategie von Hevekerl et al. (2014b) wurde die Itaconsäurekonzentration um 26 % gesteigert. Aufgrund der hohen BTM-Bildung in dieser Arbeit lag die Ausbeute im 1,5 L-Reaktor nur in einem mittleren Bereich

Tabelle 4.12 – Vergleich der Ergebnisse zur Itaconsäureproduktion mit Glucose in Rührkesselreaktoren und einer pH-Kontrolle in der fortgeschrittenen Produktionsphase.

Maßstab	pH	KH ₂ PO ₄	IA	t	Pr _{max}	Y _{P/S}
	[-]	[g/L]	[g/L]	[d]	[g/(L·h)]	[w/w]
1,5 L	3	0,8	129	6,7	1,6	0,57
	3,4	0,8	162	6,8	1,9	0,46
	3	0,1	144	11,7	1,1	0,63
	3,4	0,1	161	11,8	1,1	0,58
15 L	3	0,1	152	9,7	1,7	0,56

von 0,46 (w/w). Mit einer Produktivität von 1,01 g/(L·h) liegt diese Arbeit im oberen Bereich der in der Literatur beschriebenen Produktivitäten. Höhere oder vergleichbare Produktivitäten erreichen nur kontinuierliche Verfahren mit sehr geringen Ausbeuten von max. 0,29 (w/w) (Kautola et al., 1985) oder Kultivierungen, in denen eine Vorkultur zur Verkürzung der lag-Phase genutzt wurde (Cros and Schneider, 1993; Nubel and Ratajak, 1962). Generell betrachtet schwanken die Titer in der Literatur in Rührreaktoren zwischen 70 und 91 g/L mit einer Ausbeute von ungefähr 0,55 (w/w) (Cros and Schneider, 1993; Nubel and Ratajak, 1962; Batti and Schweiger, 1963; Kuenz et al., 2012). Teilweise laufen die Kultivierungen ohne pH-Regelung ab oder der pH-Wert wird in der Produktionsphase auf einen pH-Wert > pH 3 angehoben. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse von Karaffa et al. (2015) da. Dabei wurden Erkenntnisse aus der Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* erfolgreich auf die Itaconsäureproduktion angewendet. Die Entfernung von Manganionen aus dem Medium führte zu einer Steigerung des Titers auf 133 g/L Itaconsäure und einer Ausbeute auf 0,65 (w/w). Dieses Beispiel verdeutlicht, wie ähnlich sich Citronensäure- und Itaconsäureproduktion sind, da beide Produkte von der Gattung *Aspergillus* produziert werden und aus dem Citratzyklus stammen.

Die typische industrielle Produktion von Citronensäure liegt zwischen 160 und 200 g/L innerhalb von 5–12,5 Tagen (Anastassiadis et al., 2008; Roehr et al., 1996). Industrielle Daten für die Itaconsäureproduktion sind eher rar (Willke and Vorlop, 2001). Vermutlich liegt der typische industriell erzielte Titer zwischen 70–90 g/L basierend auf den Patenten von Batti and Schweiger (1963) und Nubel and Ratajak (1962). In Abbildung 4.42 sind vergleichend eine Produktionskurve einer typischen industriellen Citronensäureherstellung und die Itaconsäurepro-

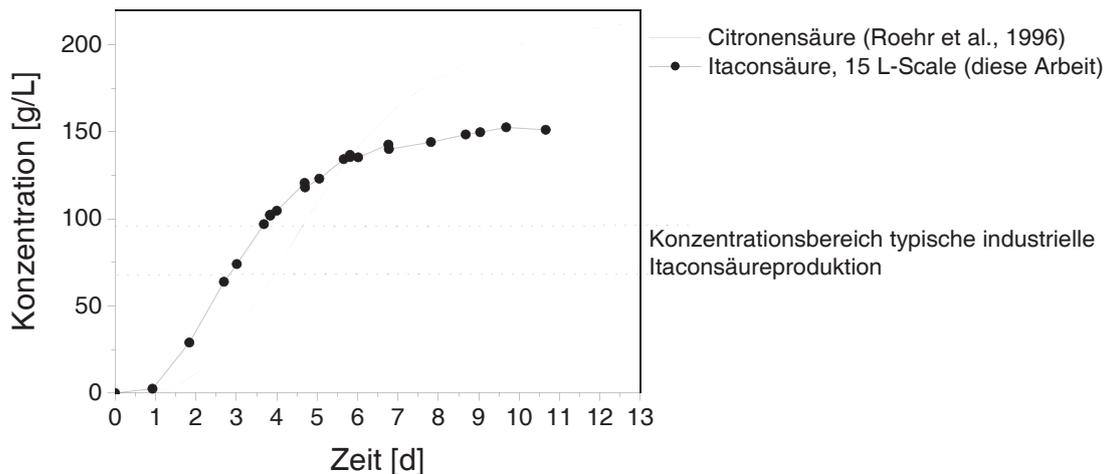


Abbildung 4.42 – Vergleich einer typischen industriellen Citronensäureproduktion mit *A. niger* nach Roehr et al. (1996) und die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* dieser Arbeit in einem 15 L-Rührreaktor. Der Konzentrationsbereich einer typischen industriellen Itaconsäureproduktion wurde auf Basis von Batti and Schweiger (1963) und Nubel and Ratajak (1962) geschätzt.

duktion dieser Arbeit im 15 L-Reaktor mit der Regelung des pH-Wertes nach 1,9 Tagen auf pH 3 dargestellt. Es wird deutlich, dass die lag-Phase der Itaconsäureproduktion im Vergleich zur Citronensäureproduktion deutlich verkürzt ist. Aus diesem Grund liegt bis zu 6,5 Tage die Konzentration der Itaconsäure oberhalb der Citronensäurekonzentration. Durch ein kontinuierliches Absinken der Produktivität ab 4,5 Tagen der Itaconsäureproduktion und einer gleichbleibenden Citronensäureproduktivität, nimmt die Citronensäurekonzentration ab diesem Zeitpunkt deutlich stärker zu. Die Itaconsäurekonzentration erreicht ihr Maximum von 152 g/L nach 9,7 Tagen und Citronensäure nach 12 Tagen mit etwa 200 g/L. Zwar liegt die erzielte Itaconsäurekonzentration noch immer unterhalb der Endkonzentration der Citronensäureproduktion, aber der anzunehmende industriell zu erzielende Konzentrationsbereich der Itaconsäureproduktion wurde deutlich übertroffen. Die entwickelte Kultivierungsstrategie dieser Arbeit mit pH-Regelung könnte durch die hohe Produktivität im Vergleich zur Citronensäureherstellung, einer guten Ausbeute von 0,56 (w/w) und einem deutlich gesteigerten Titer von 152 g/L Itaconsäure die industrielle Itaconsäureproduktion wesentlich verbessern.

Tabelle 4.13 – Vergleich der erzielten Ergebnisse mit Ergebnissen in Reaktoren aus der Literatur.

Referenz	IA [g/L]	Pr [g/(L·h)]	$Y_{P/S}$ [w/w]	t [d]	Kultivierungsstrategie
Kautola et al. (1985)	11	1,20	0,18	> 14	CSTR, immobilisiertes Mycel, ohne pH-Regelung
Kautola et al. (1990)	26	0,15	0,29	16	CSTR, immobilisiertes Mycel, ohne pH-Regelung
Okabe et al. (1993)	63	0,66	0,53	4	ALR, ohne pH-Regelung
Yahiro et al. (1995)	73	0,51	0,56	6	ALR, ohne pH-Regelung
Cros and Schneider (1993)	70	0,99	0,55	2,9	STR, Vorkultur, ohne pH-Regelung
Nubel and Ratajak (1962)	71	0,98	k.A.	3	STR, Vorkultur, pH-Anhebung nach 1 d, pH 3,8
Batti and Schweiger (1963)	90	0,56	k.A.	6,6	STR, pH-Anhebung nach 5,7 d, pH 3,2
Kuenz et al. (2012)	91	0,38	0,55	10	STR, ohne pH-Regelung
Hevekerl et al. (2014b)	129	1,15	0,58	4,7	STR, pH-Regelung nach 2 d, pH 3
Karaffa et al. (2015)	133	k.A.	0,65	k.A.	STR, manganarm, ohne pH-Kontrolle
vorliegende Arbeit, 1,5 L-Scale	162	1,01	0,46	6,7	STR, pH-Regelung nach 2 d, pH 3,4
vorliegende Arbeit, 15 L-Scale	152	0,65	0,56	9,7	STR, pH-Regelung nach 2 d, pH 3

ALR - Airlift-Reaktor, CSTR - kontinuierlicher Rührreaktor, STR - Rührreaktor



KAPITEL 5

Zusammenfassung und Ausblick

Itaconsäure zählt zu den chemischen Grundstoffen für die Polymerindustrie, die auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können. Jedoch basiert die Produktion immer noch auf reinen Zuckern, Melassen oder Stärkehydrolysaten, da der industriell verwendete Stamm *A. terreus* sehr sensitiv auf Verunreinigungen und schwankende Zusammensetzungen in alternativen Substraten reagiert. Dies hat zur Folge, dass Titer, Produktivität und Ausbeute stark absinken.

Dieses Problem wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer systematischen Studie untersucht und mögliche Störstoffe und Inhibitoren aus Hydrolysaten identifiziert und quantifiziert. Dazu wurde zuerst ein Screening auf Glucose nach alternativen Itaconsäurebildnern durchgeführt, die als weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen gelten. Es wurden mit *Ustilago maydis* DSM 17144 der Stamm mit dem höchsten Titer auf Glucose und *Ustilago rabenhorstiana* NBRC 8995 mit der geringsten Konzentration an organischen Säuren als Nebenprodukt ausgewählt. Schrittweise wurde die Nutzung unterschiedlicher Monosaccharide, der Einfluss der Enzymformulierung und von Zuckerabbauprodukten aus der Biomassevorbehandlung, sowie die Verwertung eines synthetischen Weizenkaffhydrolysats und die Auswirkungen auf die Itaconsäureproduktion untersucht. Die dabei erzielten Produktivitäten, Titer und Ausbeuten der beiden *Ustilago*-Stämme wurden mit *Aspergillus terreus* DSM 23081 verglichen.

A. terreus und *U. rabenhorstiana* zeigten ein ähnliches Substratspektrum bei den getesteten Monosacchariden. Itaconsäure wurde auf Glucose, Fructose, Mannose, Xylose und Arabinose nachgewiesen. Dagegen war es nicht möglich, mit *U. maydis* auf Xylose und Arabinose Itaconsäure zu bilden. Bei der Untersuchung möglicher Zuckerabbauprodukte lag der Vorteil bei Verunreinigung des Mediums durch schwache Säuren aufseiten der *Ustilago*-Stämme. Einer der Gründe hierfür liegt im pH-Wert der jeweiligen Kultivierungssysteme. Bei der Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* sinkt der pH-Wert auf $< \text{pH } 3,1$, die schwache Säure liegt als nicht-dissoziierte Form vor, diffundiert durch die Zellmembran ins Cytoplasma und senkt den intrazellulären pH-Wert. Der pH-Wert der *Ustilago*-Fermentation lag dagegen zwischen $\text{pH } 5,5$ – $\text{pH } 6,7$, wodurch die schwachen Säuren als Anion kaum Einfluss auf die Itaconsäurebildung zeigten. Dagegen inhibierten Konzentrationen von Furanderivaten $> 0,1 \text{ g/L}$ die Itaconsäurebildung der beiden Hefen, wobei mit *A. terreus* noch eine geringe Itaconsäureproduktion von etwa 10 % der ursprünglichen Produktivität ohne Zusatz nachgewiesen werden konnte. Die Empfindlichkeit des filamentösen Pilzes zeigte sich sehr deutlich bei der Zugabe durch das Enzym Biogazyme 2x. Die Salze der Formulierung inhibierten ab einer Konzentration von $9,4 \text{ g/L}$ Biogazyme 2x das Wachstum, wogegen es bei den *Ustilago*-Stämmen zu keinem Einbruch der Itaconsäureproduktion kam. Der größte Vorteil von *A. terreus* stellte sich bei der Untersuchung von synthetischem Weizenkaffhydrolysat heraus. Der erzielte Titer von $51,5 \text{ g/L}$ mit *A. terreus* war dreimal so hoch, wie die Titer der Hefen. Zusätzlich lag der prozentuale Anteil der Nebenprodukte bei unter 3 %, wohingegen beide *Ustilago*-Stämme neben der Bildung weiterer organischer Säuren auch die Produktion intrazellulärer Lipide zeigten. Aus diesen Gründen wurde sich für die weitere Itaconsäureproduktion auf Basis von Lignocellulose für den filamentösen Pilz *A. terreus* entschieden.

Auf der Grundlage von systematischen Untersuchungen zu störenden Komponenten im Kultivierungsmedium von *A. terreus* wurde eine alkalische Vorbehandlung für das Weizenkaff ausgewählt. Diese Methode zeigt bei Raumtemperatur geringe Konzentrationen an störenden Zuckerabbauprodukten und ist zudem effektiv bei der Auflösung der komplexen Struktur der Lignocellulose. Zuckerabbauprodukte wie Acetat wurden mittels Waschschritten vor der enzymatischen Hydrolyse bei $\text{pH } 4,8$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und $10 \text{ FPU/g}_{\text{Biomasse}}$ Biogazyme 2x entfernt. Durch Eindampfen des Hydrolysats wurden die enthaltene Glucose, Xylose und Arabinose aufkonzentriert und störende Proteine ausgefällt. Mit dem so erhaltenen Hydrolysat konnten ohne aufwendiges Aufreinigungsverfahren mit *A. terreus*

23,3 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,27 (w/w) erzielt werden. Eine zusätzliche Aufreinigung des Hydrolysats mittels Kationentauscher führte zu einer Steigerung des Titors auf 27,7 g/L Itaconsäure und einer Ausbeute von 0,41 (w/w). Somit ist es auf Basis der systematischen Studie gelungen, Weizenkaff erfolgreich für die Itaconsäureproduktion zu nutzen. Spezielle Einflussfaktoren wurden herausgearbeitet und dienen als Grundlage für zukünftige Arbeiten mit *A. terreus* auf nachwachsenden Rohstoffen. Verglichen mit der Verwendung von Glucose als Substrat sind die erzielten Ergebnisse mittelmäßig und die miteinander kombinierten Verfahren (Vorbehandlung, enzymatische Hydrolyse und Aufreinigung) bilden noch keinen attraktiven Prozess auf Basis von Lignocellulose mit hoher Itaconsäureausbeute und hohem Titer. Unter Berücksichtigung der herausgestellten Inhibitoren, höheren Zuckerkonzentrationen, einer Optimierung oder Änderung in der Vorbehandlung und enzymatischen Hydrolyse, kann jedoch ein attraktiver Prozess für die Produktion von Itaconsäure auf Basis nachwachsender lignocellulosehaltiger Rohstoffe entwickelt werden.

Neben der Produktion von Itaconsäure auf Basis von Weizenkaff als lignocellulosehaltigem Substrat, wurde auch die Produktion auf Basis von Glucose weiter untersucht. Dabei wurde im Detail der Einfluss des pH-Wertes auf die Kultivierung untersucht, der bereits bei Hevekerl et al. (2014b) zu einer Steigerung des Titors von 91 g/L auf 129 g/L Itaconsäure führte, indem der pH-Wert nach zwei Tagen auf pH 3 angehoben und geregelt wurde. In dieser Arbeit stellt sich heraus, dass der Zeitpunkt der Aktivierung für die pH-Regelung kein fest gewählter Zeitpunkt sein muss, sondern lediglich in der fortgeschrittenen Produktionsphase gewählt werden muss, um eine Steigerung der Itaconsäurekonzentration zu erzielen. Die fortgeschrittene Produktionsphase liegt bei einer Itaconsäurekonzentration > 20 g/L. Somit kann die Aktivierung der pH-Regelung frei im Konzentrationsbereich von 20–70 g/L Itaconsäure aktiviert werden. Zusätzlich stellte sich heraus, dass der optimale pH-Wert für eine Regelung bei pH 3,4 liegt. Diese Optimierung führte im Vergleich zu Hevekerl et al. (2014b) zu einer Steigerung des Titors um weitere 26 % auf 162 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,46 (w/w). Aktuell ist dieser Wert die höchste veröffentlichte Itaconsäurekonzentration in der Literatur. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass während der Kultivierung weder eine Phosphat-, noch eine Stickstofflimitierung vorlag. Auch eine negative Beeinflussung des Titors durch eine zu hohe Mangankonzentration im Medium konnte ausgeschlossen werden.

Mit zunehmendem pH-Wert nimmt auch die Löslichkeit der Itaconsäure in der Fermentationsbrühe zu, indem sich der Dissoziationsgrad von Itaconsäure zu Itaconat verschiebt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Titers und dem steigenden Anteil des Itaconates (HIA^-) festgestellt werden. Vermutlich diffundiert die undissoziierte Itaconsäure in die Zelle und dissoziiert dort in Anion und Proton. Das Proton wird unter ATP-Verbrauch wieder aus der Zelle transportiert und um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten. Abhängig von der Versorgung der Biomasse mit Sauerstoff, dem Rührsystem oder der Morphologie des Pilzes kann die Zelle nur bestimmte Maximalkonzentrationen an H_2IA (115–123 g/L) ausgleichen. Somit führte die pH-Regelung dazu, dass in der Fermentationsbrühe für *A. terreus* unschädliches HIA^- entstand und deswegen die Endkonzentration weiter gesteigert werden konnte. Der genaue Einfluss der einzelnen Dissoziationsformen auf die Zelle sollte für eine genauere Aussage näher betrachtet werden.

Eine weitere Erhöhung des pH-Werts auf pH 3,6 war nicht zielführend. Es bildeten sich kompaktere und größere Pellets mit einer geringeren Produktivität und niedrigerem Titer. Generell ist eine weitere Steigerung des Titers bei höheren pH-Werten mit Verschiebung des Dissoziationsgrades denkbar, wenn es gelingt, dass sich die Morphologie von *A. terreus* nicht verändert. In nachfolgenden Untersuchungen sollte daher der Fokus auf einer gleichbleibenden Morphologie liegen.

Die Kultivierung wurde zudem erfolgreich vom 1,5 L-Maßstab in den 15 L-Maßstab überführt. Auch hier kam es zu einer abweichenden Morphologie und einer erhöhten Biomassebildung. Aus diesem Grund wurde die Phosphatkonzentration von 0,8 g/L auf 0,1 g/L KH_2PO_4 reduziert und der pH-Wert nur auf pH 3,0 angehoben. Es konnte eine Itaconsäurekonzentration von 152 g/L mit einer Ausbeute von 0,56 (w/w) erzielt werden. Somit ist es gelungen, die Itaconsäureproduktion mit einem *A. terreus*-Wildtypstamm weiter zu verbessern und ein ähnliches Konzentrationsniveau wie bei der industriellen Citronensäureproduktion zu erlangen. Somit können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die industrielle Itaconsäureproduktion deutlich verbessern und zu einer Verringerung der Produktionskosten führen.



Literaturverzeichnis

- Agbor, V. B., N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, and D. B. Levin (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol Adv* 29(6), 675 – 685.
- Alfani, F., A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, and M. Cantarella (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J Ind Microbiol Biot* 25(4), 184–192.
- Almeida, J. R., T. Modig, A. Petersson, B. Hähn-Hägerdal, G. Liden, and M. F. Gorwa-Grauslund (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biot* 82(4), 340–349.
- Alvira, P., E. Tomas-Pejo, M. Ballesteros, and M. Negro (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technol* 101(13), 4851 – 4861. Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives.
- Anastassiadis, S., I. G. Morgunov, S. V. Kamzolova, and T. V. Finogenova (2008). Citric acid production patent review. *Recent Pat Biotechnol* 2(2), 107–123.
- Anders, N. (2014). *Hydrolyse von agrarischen Rest- und Rohstoffen: Katalysatorscreening für die Verzuckerung von Weizenkaff*. Cuvillier Verlag.
- Axe, D. D. and J. E. Bailey (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 47(1), 8–19.
- Banerjee, N., R. Bhatnagar, and L. Viswanathan (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Appl Microbiol* 11(4), 226–228.
- Batti, M. and L. Schweiger (1963). Process for the production of itaconic acid. US Patent 3,078,217 (to Miles Laboratories).



- Batti, M. A. (1964). Process for the production of itaconic acid. US Patent 3,162,582 (to Miles Laboratories).
- Baup, S. (1837). Über eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Ann Phar* 19(1), 29–38.
- Beckmann, E., O. Liesche, and F. Lehmann (1921). Lignin aus Winterroggenstroh. *Angew Chem* 34(50), 285–288.
- Begerow, D., M. Stoll, and R. Bauer (2006). A phylogenetic hypothesis of *Ustilaginomycotina* based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98(6), 906–916.
- Beneke, F. and J. Rumpler (2013). Application of sensitivity models for renewable resources and co-products. In: J. Geldermann, M. Schumann editors. *First International Conference on Resource Efficiency in Interorganizational Networks ResEff 2013*, 57–68.
- Berg, R. G. and D. S. Hetzel (1978). Preparation of citraconic anhydride. US Patent 4,100,179 A (to Pfizer Inc.).
- Blazeck, J., A. Hill, M. Jamoussi, A. Pan, J. Miller, and H. S. Alper (2015). Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production. *Metab Eng* 32, 66 – 73.
- Blazeck, J., J. Miller, A. Pan, J. Gengler, C. Holden, M. Jamoussi, and H. S. Alper (2014). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for itaconic acid production. *Appl Microbiol Biot* 98(19), 8155–8164.
- Boekhout, T. (2011). Chapter 153 - *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout (1985) and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (de candolle) corda (1842). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 1857 – 1868. London: Elsevier.
- Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology+* 147(6), 1395–1401.
- Bölker, M., C. W. Basse, and J. Schirawski (2008). *Ustilago maydis* secondary metabolism - from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biology* 45, 88 – 93. Thematic Issue: *Ustilago maydis*.
- Bonnarme, P., B. Gillet, A. Sepulchre, C. Role, J. Beloeil, and C. Ducrocq (1995). Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J Bacteriol* 177(12), 3573–3578.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1), 248 – 254.



- Calam, C. T., A. E. Oxford, and H. Raistrick (1939). Studies in the biochemistry of microorganisms: Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus* Thom. *Biochem J* 33(9), 1488.
- Cannell, R. (1998). *Natural Products Isolation - Methods in biotechnology*. Humana Press.
- Chen, M., X. Huang, C. Zhong, J. Li, and X. Lu (2016). Identification of an itaconic acid degrading pathway in itaconic acid producing *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biot* 100(17), 7541–7548.
- Chin, T., M. Sano, T. Takahashi, H. Ohara, and Y. Aso (2015). Photosynthetic production of itaconic acid in *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Biotechnol* 195, 43 – 45.
- Clark, D. S., K. Ito, and H. Horitsu (1966). Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnol Bioeng* 8(4), 465–471.
- Collins, S. R., N. Wellner, I. Martinez Bordonado, A. L. Harper, C. N. Miller, I. Bancroft, and K. W. Waldron (2014). Variation in the chemical composition of wheat straw: the role of tissue ratio and composition. *Biotechnol Biofuels* 7(1), 121.
- Coughlan, M. and G. P. Hazlewood (1993). beta-1,4-d-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol Appl Bioc* 17(3), 259–289.
- Cros, P. and D. Schneider (1993). Microbiological production of itaconic acid. US Patent 5,231,016 (to Rhone-Poulenc Chimie).
- Dadi, A. P., S. Varanasi, and C. A. Schall (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol Bioeng* 95(5), 904–910.
- Deak, E., S. D. Wilson, E. White, J. H. Carr, and S. A. Balajee (2009). *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. *PLoS One* 4(10), 7673.
- Delidovich, I., P. J. Hausoul, L. Deng, R. Pfüützenreuter, M. Rose, and R. Palkovits (2015). Alternative monomers based on lignocellulose and their use for polymer production. *Chem Rev* 116(3), 1540–1599.
- Demirbaş, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energ Convers Manage* 42(11), 1357–1378.
- Diao, B., Z. Zhang, J. Zhu, and J. Li (2014). Biomass-based thermogelling copolymers consisting of lignin and grafted poly(n-isopropylacrylamide), poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol). *RSC Adv.* 4, 42996–43003.



- Driouch, H., A. Roth, P. Dersch, and C. Wittmann (2011). Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioeng Bugs* 2(2), 100–104. PMID: 21636997.
- Du, B., L. N. Sharma, C. Becker, S.-F. Chen, R. A. Mowery, G. P. van Walsum, and C. K. Chambliss (2010). Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnol Bioeng* 107(3), 430–440.
- Duguid, K., M. Montross, C. Radtke, C. Crofcheck, S. Shearer, and R. Hoskinson (2007). Screening for sugar and ethanol processing characteristics from anatomical fractions of wheat stover. *Biomass Bioenergy* 31(8), 585 – 592.
- Durant, Y. (2009). Development of integrated production of polyitaconic acid from northeast hardwood biomass - NIFA project 2009-2012. Technical report, Itaconix, LCC.
- Dwiarti, L., M. Otsuka, S. Miura, M. Yaguchi, and M. Okabe (2007). Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by *Aspergillus terreus* TN484-M1. *Bioresource Technol* 98(17), 3329 – 3337.
- Dwiarti, L., K. Yamane, H. Yamatani, P. Kahar, and M. Okabe (2002). Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *J Biosci Bioeng* 94(1), 29 – 33.
- Ebringerová, A., Z. Hromádková, and T. Heinze (2005). *Hemicellulose*, pp. 1–67. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Eggersdorfer, M., J. Meyer, and P. Eckes (1992). Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol Lett* 103(2-4), 355–365.
- Eimhjellen, K. E. and H. Larsen (1955). The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. 2. the effect of substrates and inhibitors. *Biochem J* 60(1), 139–147.
- FitzPatrick, M., P. Champagne, M. F. Cunningham, and R. A. Whitney (2010). A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technol* 101(23), 8915–8922.
- Fuchs, G. and H. Schlegel (2006). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Flexible Taschenbücher. Thieme Georg Verlag.
- Galbe, M. and G. Zacchi (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biot* 59(6), 618–628.
- Gao, Q., J. Liu, and L. Liu (2014). Relationship between morphology and itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechnol* 24 (2), 168–176.



- Geiser, E., S. K. Przybilla, A. Friedrich, W. Buckel, N. Wierckx, L. M. Blank, and M. Bölker (2015). *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. *Microb Biotechnol* 9(1), 116–126.
- Geiser, E., V. Wiebach, N. Wierckx, and L. M. Blank (2014). Prospecting the biodiversity of the fungal family *Ustilaginaceae* for the production of value-added chemicals. *Fungal Biol Biotechnol* 1(1), 2.
- Geitmann, S. (2005). *Erneuerbare Energien und alternative Kraftstoffe*. Hydrogeit-Verl.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59, 257–268.
- Gibbs, P. A., R. J. Seviour, and F. Schmid (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* 20(1), 17–48.
- Greenspan, P., E. P. Mayer, and S. D. Fowler (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100(3), 965–973.
- Guevarra, E. D. and T. Tabuchi (1990). Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartaric, and malic acids by strains of the genus *Ustilago*. *Agric Biol Chem* 54, 2353–2358.
- Gutz, I. G. R. (2016). *CurTiPot - pH and Acid-Base Titration Curves: Analysis and Simulation freeware, version 4.2*.
- Gyamerah, M. (1995a). Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl Microbiol Biot* 44(3), 356–361.
- Gyamerah, M. H. (1995b). Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Appl Microbiol Biot* 44(1), 20–26.
- Harder, B.-J., K. Bettenbrock, and S. Klamt (2016). Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Metab Eng* 38, 29 – 37.
- Harper, S. H. T. and J. M. Lynch (1981). The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *J Sci Food Agr* 32(11), 1057–1062.
- Haskins, R., J. Thorn, and B. Boothroyd (1955). Biochemistry of the *Ustilaginales*: Xi. metabolic products of *Ustilago zae* in submerged culture. *Can J Microbiol* 1(9), 749–756.



- Heiss, R. and K. Eichner (2002). *Haltbarmachen von Lebensmitteln: chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätserhaltung*. Springer Berlin Heidelberg.
- Hendriks, A. and G. Zeeman (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 100(1), 10 – 18.
- Hesse, S. J. A., G. J. G. Ruijter, C. Dijkema, and J. Visser (2002). Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* 269(14), 3485–3494.
- Hevekerl, A. (2016). *Biotechnisch erzeugte Itaconsäure*. Cuvillier Verlag.
- Hevekerl, A., A. Kuenz, and K.-D. Vorlop (2014a). Filamentous fungi in microtiter plates—an easy way to optimize itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biot* 98(16), 6983–6989.
- Hevekerl, A., A. Kuenz, and K.-D. Vorlop (2014b). Influence of the pH on the itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biot* 98(24), 10005–10012.
- Hewald, S., K. Josephs, and M. Bölker (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microb* 71(6), 3033–3040.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. T. Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y.-C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Koljalg, C. P. Kurtzman, K.-H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miadlikowska, A. Miller, J.-M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schüßler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y.-J. Yao, and N. Zhang (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111(5), 509 – 547.
- Hossain, A. H., A. Li, A. Brickwedde, L. Wilms, M. Caspers, K. Overkamp, and P. J. Punt (2016, Jul). Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact* 15(1), 130.
- Huber, G. W., S. Iborra, and A. Corma (2006). Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem Rev* 106(9), 4044–4098.

- Iwaki, A., S. Ohnuki, Y. Suga, S. Izawa, and Y. Ohya (2013). Vanillin inhibits translation and induces messenger ribonucleoprotein (mRNP) granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*: application and validation of high-content, image-based profiling. *PLoS one* 8(4), e61748.
- Jackson, M. (1977). Review article: The alkali treatment of straws. *Anim Feed Sci Tech* 2(2), 105 – 130.
- Jäger, G. and J. Büchs (2012). Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnol J* 7(9), 1122–1136.
- Jaklitsch, W. M., C. P. Kubicek, and M. C. Scrutton (1991). The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Microbiology+* 137(3), 533–539.
- Janga, K. K., M.-B. Hägg, and S. T. Moe (2011). Influence of acid concentration, temperature, and time on the concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and aspenwood: A statistical approach. *BioResources* 7(1), 0391–0411.
- John, R. P., K. M. Nampoothiri, and A. Pandey (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biot* 74(3), 524–534.
- Jönsson, L. J., B. Alriksson, and N.-O. Nilvebrant (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 6(1), 16.
- Jurchescu, I.-M. (2014). *2,3-Butanediol Production with GRAS Microorganisms - Screening, Cultivation, Optimization and Scale-Up* -. Ph. D. thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Kamper, J., R. Kahmann, M. Bolker, L.-J. Ma, T. Brefort, B. J. Saville, F. Banuett, J. W. Kronstad, S. E. Gold, O. Muller, M. H. Perlin, H. A. B. Wosten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C. G. Reynaga-Pena, K. Snetselaar, M. McCann, J. Perez-Martin, M. Feldbrugge, C. W. Basse, G. Steinberg, J. I. Ibeas, W. Holloman, P. Guzman, M. Farman, J. E. Stajich, R. Sentandreu, J. M. Gonzalez-Prieto, J. C. Kennell, L. Molina, J. Schirawski, A. Mendoza-Mendoza, D. Greilinger, K. Munch, N. Rossel, M. Scherer, M. Vranes, O. Ladendorf, V. Vincon, U. Fuchs, B. Sandrock, S. Meng, E. C. H. Ho, M. J. Cahill, K. J. Boyce, J. Klose, S. J. Klosterman, H. J. Deelstra, L. Ortiz-Castellanos, W. Li, P. Sanchez-Alonso, P. H. Schreier, I. Hauser-Hahn, M. Vaupel, E. Koopmann, G. Friedrich, H. Voss, T. Schluter, J. Margolis, D. Platt, C. Swimmer, A. Gnirke, F. Chen, V. Vysotskaia, G. Mannhaupt, U. Guldener, M. Munsterkotter, D. Haase, M. Oesterheld, H.-W. Mewes, E. W. Mauceli, D. DeCaprio, C. M. Wade, J. Butler, S. Young, D. B. Jaffe, S. Calvo, C. Nusbaum, J. Galagan, and B. W. Birren (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444(7115), 97–101.
- Kane, J., A. Finlay, and P. Amann (1945). Production of itaconic acid. US Patent 2,385,283.



- Karaffa, L., R. Díaz, B. Papp, E. Fekete, E. Sándor, and C. P. Kubicek (2015). A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biot* 99(19), 7937–7944.
- Karaffa, L. and C. P. Kubicek (2003, May). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biot* 61(3), 189–196.
- Kautola, H. (1990). Itaconic acid production from xylose in repeated-batch and continuous bioreactors. *Appl Microbiol Biot* 33(1), 7–11.
- Kautola, H., M. Vahvaselkä, Y. Y. Linko, and P. Linko (1985). Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose. *Biotechnol Lett* 7(3), 167–172.
- Kautola, H., N. Vassilev, and Y.-Y. Linko (1990). Continuous itaconic acid production by immobilized biocatalysts. *J Biotechnol* 13(4), 315 – 323.
- Kawamura, D., M. Furuhashi, O. Saito, and H. Matsui (1981). Production of itaconic acid by fermentation. JP Patent 56137893 (to Shizuoka Prefecture, Iwata Kagaku Kogyo).
- Keweloh, H., G. Weyrauch, and H.-J. Rehm (1990). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot* 33(1), 66–71.
- Kim, J. S., Y. Lee, and T. H. Kim (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 199, 42 – 48. Pretreatment of Biomass.
- Kinoshita, K. (1932). Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim* 5, 271–287.
- Kisser, M., C. P. Kubicek, and M. Röhr (1980). Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation. *Arch Microbiol* 128(1), 26–33.
- Klement, T. and J. Büchs (2013). Itaconic acid—a biotechnological process in change. *Bioresource Technol* 135, 422–431.
- Klement, T., S. Milker, G. Jäger, P. M. Grande, P. Domínguez de María, and J. Büchs (2012). Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microb Cell Fact* 11(1), 43.
- Kobayashi, T. (1978). Production of itaconic acid from wood waste. *Process Biochem* 13(5), 15–22.
- Kück, U., M. Nowrousian, J. Reiß, B. Hoff, and I. Engh (2009). *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer.

- Kuenz, A. (2008). *Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure*. Ph. D. thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Kuenz, A., Y. Gallenmüller, T. Willke, and K.-D. Vorlop (2012). Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biot* 96(5), 1209–1216.
- Kühn, J. (1876). *Ustilago rabenhorstiana* Kühn. *Hedwigia Hedwigia*, 4–6.
- Kumar, P., D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* 48(8), 3713–3729.
- Kumar, S., S. Krishnan, S. K. Samal, S. Mohanty, and S. K. Nayak (2017). Itaconic acid used as a versatile building block for the synthesis of renewable resource-based resins and polyesters for future prospective: a review. 10.1002/pi.5399.
- Lambert, R. J. and M. Stratford (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J Appl Microbiol* 86(1), 157–164.
- Lan, T. Q., H. Lou, and J. Y. Zhu (2013). Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2. *Bioenerg Res* 6(2), 476–485.
- Larsen, H. and K. E. Eimhjellen (1955). The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. 1. the effect of acidity. *Biochem J* 60(1), 135–139.
- Larsen, S. U., S. Bruun, and J. Lindedam (2012). Straw yield and saccharification potential for ethanol in cereal species and wheat cultivars. *Biomass Bioenergy* 45, 239 – 250.
- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, and N.-O. Nilvebrant (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Tech* 24(3), 151–159.
- Lawther, J. M., R. Sun, and W. Banks (1996). Fractional characterization of wheat straw lignin components by alkaline nitrobenzene oxidation and FT-IR spectroscopy. *J Agr Food Chem* 44(5), 1241–1247.
- Lee, S. and Y. Shah (2012). *Biofuels and Bioenergy: Processes and Technologies*. Green Chemistry and Chemical Engineering. CRC Press.
- Levinson, W. E., C. P. Kurtzman, and T. M. Kuo (2006). Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme Microb Tech* 39(4), 824–827.
- Lewis, T., P. D. Nichols, and T. A. McMeekin (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J Microbiol Meth* 43(2), 107 – 116.



- Li, A., N. van Luijk, M. ter Beek, M. Caspers, P. Punt, and M. van der Werf (2011). A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. *Fungal Genet Biol* 48(6), 602 – 611. Special Section: Tuber Genome.
- Li, X., K. Zheng, C. Lai, J. Ouyang, and Q. Yong (2016). Improved itaconic acid production from undetoxified enzymatic hydrolysate of steam-exploded corn stover using an *Aspergillus terreus* mutant generated by atmospheric and room temperature plasma. *BioResources* 11(4), 9047–9058.
- Liu, L., X. P. Ye, A. R. Womac, and S. Sokhansanj (2010). Variability of biomass chemical composition and rapid analysis using FT-NIR techniques. *Carbohydr Polym* 81(4), 820 – 829.
- Lockwood, L. and M. Reeves (1946). Some factors affecting the production of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Arch Biochem* 6(3), 455–469.
- Luskin, L. (1974). Acidic monomers. III. itaconic acid. *Functional monomers: their preparation, polymerisation and application* 2, 465–501.
- Lynd, L. R., W. H. Van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotech* 16(5), 577–583.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol R* 66(3), 506–577.
- Lynd, L. R., C. E. Wyman, and T. U. Gerngross (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnol Progr* 15(5), 777–793.
- Maassen, N., M. Panakova, N. Wierckx, E. Geiser, M. Zimmermann, M. Bölker, U. Klinner, and L. M. Blank (2014). Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Eng Life Sci* 14(2), 129–134.
- Magalhães, A. I., J. C. de Carvalho, J. D. C. Medina, and C. R. Soccol (2017). Downstream process development in biotechnological itaconic acid manufacturing. *Appl Microbiol Biot* 101(1), 1–12.
- Maiorella, B., H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 25(1), 103–121.
- Marques, S., L. Alves, J. Roseiro, and F. Gírio (2008). Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass Bioenergy* 32(5), 400–406.

- Martinez-Espinoza, A. D., M. D. Garcia-Pedrajas, and S. E. Gold (2002). The *Ustilaginales* as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology* 35(1), 1 – 20.
- McCartney, D. H., H. C. Block, P. L. Dubeski, and A. J. Ohama (2006). Review: The composition and availability of straw and chaff from small grain cereals for beef cattle in western Canada. *Canadian Journal of Animal Science* 86(4), 443–455.
- Menon, V. and M. Rao (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energ Combust* 38(4), 522 – 550.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3), 426–428.
- Modig, T., G. Lidée, and M. J. Taherzadeh (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 363(3), 769–776.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 96(6), 673 – 686.
- Mosier, N. S., P. Hall, C. M. Ladisch, and M. R. Ladisch (1999). *Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins*, pp. 23–40. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Motte, J. C., R. Escudie, N. Beaufile, J. P. Steyer, N. Bernet, J. P. Delgenes, and C. Dumas (2014). Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Ind Crop Prod* 52, 695–701.
- Nubel, R. and E. Ratajak (1962). Process for producing itaconic acid. US Patent 3,044,941 (to Pfizer & Co).
- Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa, and E. Y. Park (2009). Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biot* 84(4), 597–606.
- Okabe, M., N. Ohta, and Y. S. Park (1993). Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. *J Ferment Bioeng* 76(2), 117 – 122.
- Olson, D. G., J. E. McBride, A. J. Shaw, and L. R. Lynd (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotech* 23(3), 396 – 405.
- Otten, A., M. Brocker, and M. Bott (2015). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconate. *Metab Eng* 30, 156 – 165.



- Palmqvist, E., H. Grage, N. Q. Meinander, and B. Hahn-Hägerdal (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng* 63, 46 – 55.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol* 74(1), 25 – 33.
- Pampulha, M. E. and M. C. Loureiro-Dias (1989). Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl Microbiol Biot* 31(5), 547–550.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol R* 62(1), 1–34.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22(3), 189 – 259.
- Park, Y. S., N. Ohta, and M. Okabe (1993). Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett* 15(6), 583–586.
- Pedroso, G. B., S. Montipo, D. A. N. Mario, S. H. Alves, and A. F. Martins (2017). Building block itaconic acid from left-over biomass. *Biomass Convers Biorefin* 7(1), 23–35.
- Perlack, R. D., L. M. Eaton, A. F. Turhollow Jr, M. H. Langholtz, C. C. Brandt, M. E. Downing, R. L. Graham, L. L. Wright, J. M. Kavkewitz, A. M. Shamey, et al. (2011). US billion-ton update: biomass supply for a bioenergy and bioproducts industry. Technical report, United States Department of Energy.
- Petrucchioli, M., V. Pulci, and F. Federici (1999). Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* on raw starchy materials. *Lett Appl Microbiol* 28(4), 309–312.
- Philippidis, G. P., T. K. Smith, and C. E. Wyman (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol Bioeng* 41(9), 846–853.
- Pizzi, A. and N. Eaton (1985). The structure of cellulose by conformational analysis. 2. the cellulose polymer chain. *J Macromol Sci A* 22:1, 105–137.
- Plumridge, A., S. J. A. Hesse, A. J. Watson, K. C. Lowe, M. Stratford, and D. B. Archer (2004). The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl Environ Microb* 70(6), 3506–3511.
- Reddy, C. and R. Singh (2002). Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR10. *Bioresource Technol* 85(1), 69 – 71.



- Riscaldati, E., M. Moresi, M. Petruccioli, and F. Federici (2000). Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol* 83(3), 219 – 230.
- Robert, T. and S. Friebel (2016). Itaconic acid - a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chem* 18, 2922–2934.
- Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek (1996). *Citric acid, in Biotechnology: Products of primary metabolism, Volume 6, Second Edition* (eds H.-J. Rehm and G. Reed), pp. 307–345. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Rowell, R. M. (2012). *Handbook of wood chemistry and wood composites*. CRC press.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454(7206), 841.
- Russell, J. (1992). Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J Appl Bacteriol* 73(5), 363–370.
- Rychtera, M. and D. A. J. Wase (1981). The growth of *Aspergillus terreus* and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. the influence of pH. *J Chem Technol Biot* 31(1), 509–521.
- Saha, B. C., G. J. Kennedy, N. Qureshi, and M. J. Bowman (2017). Production of itaconic acid from pentose sugars by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Progr* 33(4), 1059–1067.
- Sassner, P., M. Galbe, and G. Zacchi (2008). Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32(5), 422 – 430.
- Sayama, A., K. Kobayashi, and A. Ogoshi (1994). Morphological and physiological comparisons of *Helicobasidium mompa* and *H. purpureum*. *Mycoscience* 35(1), 15–20.
- Shin, W.-S., D. Lee, S. Kim, Y.-S. Jeong, G.-T. Chun, et al. (2013). Application of scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient (kLa) for production of itaconic acid in a 50 L pilot-scale fermentor by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechn* 23(10), 1445–1453.
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure* 1617, 1–16.
- Specht, R., I. Andreas, E. Kreyß, P. Gerold, and C. Bodinus (2014). Verfahren zur biotechnologischen herstellung von itaconsäure. DE Patent 102,008,011,854 (to Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-Ufz, Technische Universität Dresden).



- Spencer, R. R. and D. E. Akin (1980). Rumen microbial degradation of potassium hydroxide-treated coastal bermudagrass leaf blades examined by electron microscopy. *J Anim Sci* 51, 1189–1196.
- Steiger, M., M. Blumhoff, D. Mattanovich, and M. Sauer (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front Microbiol* 4, 23.
- Stergiopoulos, I., L.-H. Zwieters, and M. A. De Waard (2002). Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *Eur J Plant Pathol* 108(7), 719–734.
- Stichnothe, H., H. Storz, D. Meier, I. de Bari, and S. Thomas (2016). Development of second generation biorefineries. In J. Hess, P. Lamers, H. Stichnothe, M. Beermann, and G. Jungmeier (Eds.), *Developing the Global Bioeconomy: Technical, Market, and Environmental Lessons from Bioenergy*, Chapter 2, pp. 11–40. Academic Press.
- Strelko, C. L., W. Lu, F. J. Dufort, T. N. Seyfried, T. C. Chiles, J. D. Rabinowitz, and M. F. Roberts (2011). Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc* 133(41), 16386–16389.
- Sun, R., J. Lawther, and W. Banks (1995). Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Ind Crop Prod* 4(2), 127 – 145.
- Sunna, A. and G. Antranikian (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17(1), 39–67.
- Szengyel, Z. and G. Zacchi (2000). Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Appl Biochem Biotech* 89(1), 31–42.
- Tabuchi, T. and T. Nakahara (1980). Preparation of itaconic acid. JP Patent 55034017 (to Mitsubishi).
- Tabuchi, T., T. Sugisawa, T. Ishidori, T. Nakahara, and J. Sugiyama (1981). Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*. *Agr Biol Chem Tokyo* 45(2), 475–479.
- Taherzadeh, M. J., L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Lidén (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biot* 53(6), 701–708.
- Tate, B. (1981). Itaconic acid and derivatives. *Grayson M Eckroth E (eds) Kirk-Othmer Encycl Chem Technol* 3, 865–873.
- Tippkötter, N., A.-M. Duwe, S. Wiesen, T. Sieker, and R. Ulber (2014). Enzymatic hydrolysis of beech wood lignocellulose at high solid contents and its utilization as substrate for the production of biobutanol and dicarboxylic acids. *Bioresource Technol* 167, 447 – 455.



- Tomlinson, N., J. Campbell, and P. C. Trussell (1950). The influence of zinc, iron, copper, and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *J Bacteriol* 59(2)(2), 217–227.
- Tsao, G., P. Ouyang, and J. Chen (2010). *Biotechnology in China II: Chemicals, Energy and Environment*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg.
- van der Pol, E. C., R. R. Bakker, P. Baets, and G. Eggink (2014). By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Appl Microbiol Biot* 98(23), 9579–9593.
- Viegas, C. A. and I. Sa-Correia (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *Microbiology+* 137(3), 645–651.
- Von Fries, H. (1966). Verfahren zur fermentativen Herstellung von Itaconsäure durch submers-aerobe Schimmelpilzgärung. *DE Patent* 1(219), 430.
- Weastra, s.r.o. (2013). Wp 8.1, determination of market potential for selected platform chemicals: Itaconic acid, succinic acid, 2,5-furandicarboxylic acid. Technical report, Bioconcept.
- Welter, K. (2000). *Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen*. Ph. D. thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Werpy, T., G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Eliot, L. Lasure, and S. Jones (2004). Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Technical report, Department of Energy Washington DC.
- Willke, T. and K.-D. Vorlop (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biot* 56, 289–295.
- Wu, X., Q. Liu, Y. Deng, J. Li, X. Chen, Y. Gu, X. Lv, Z. Zheng, S. Jiang, and X. Li (2017). Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant. *Bioresource Technol* 241, 25 – 34.
- Wüstenberg, T. (2013). *Cellulose und Cellulosederivate: Grundlagen, Wirkungen und Applikationen*. Behr's Verlag DE.
- Wyman, C. E. (1995). Ethanol production from lignocellulosic biomass. Technical report, American Society of Mechanical Engineers, New York.
- Wyman, C. E., S. R. Decker, M. E. Himmel, J. W. Brady, C. E. Skopec, and L. Viikari (2005). Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* 1, 1023–1062.



- Yahiro, K., S. Shibata, S.-R. Jia, Y. Park, and M. Okabe (1997). Efficient itaconic acid production from raw corn starch. *J Ferment Bioeng* 84(4), 375 – 377.
- Yahiro, K., T. Takahama, Y. S. Park, and M. Okabe (1995). Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield. *J Ferment Bioeng* 79(5), 506 – 508.
- Zeng, J., G. L. Helms, X. Gao, and S. Chen (2013). Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. *J Agr Food Chem* 61(46), 10848–10857.
- Zhang, J., A. Geng, C. Yao, Y. Lu, and Q. Li (2012). Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. *Bioresource Technol* 121, 369 – 378.
- Zhang, X., X.-F. Zhang, H.-P. Li, L.-Y. Wang, C. Zhang, X.-H. Xing, and C.-Y. Bao (2014). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Appl Microbiol Biot* 98(12), 5387–5396.



ANHANG A

Verzeichnisse und Listen

A.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Tabelle A.1 – Liste der verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bezeichnung
A	Aktivkohle
Adi1	Aconitat- Δ -Isomerase
ALR	Airlift-Reaktor
ATP	Adenosintri-phosphat
BTM	Biotrockenmasse
CAD	cis-Aconitat-Decarboxylase
CBP	konsolidierter Bioprozess engl.: consolidated bioprocessing
CSTR	kontinuierlicher Rührkesselreaktor engl.: continuously stirred tank reactor
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
DO	Sauerstoffsättigung engl.: dissolved oxygen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EG	Endoglucanase
EMPP	Embden-Meyerhof-Parnas Weg engl.: Embden-Meyerhof-Parnas pathway



Abkürzung	Bezeichnung
ERY	Erythrit
EX	Exoglucanase
FPU	Filterpapiereinheiten engl.: filter paper units
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Koppelung engl.: gas chromatography–mass spectrometry
H ₂ IA	nicht-dissoziierte Itaconsäure
HIA ⁻	einfach-dissoziierte Itaconsäure
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie engl.: high performance anion exchange chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie engl.: high performance liquid chromatography
IA	Itaconsäure
IA ²⁻	zweifach-dissoziierte Itaconsäure
IC	Ionenchromatographie
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma engl.: inductively coupled plasma
Itp1	Itaconsäureexporter
K	Kationentauscher
k. A.	keine Angabe
MAL	Malat
MEL	Mannosylerythritollipid
MfS	Major-Facilitator-Superfamilie
Mtt1	mitochondraler cis-Aconiatatexporter
OD	optische Dichte
OES	optische Emissionsspektrometrie
PAD	gepulste amperometrische Detektion engl.: pulsed amperometric detection
PPP	Pentosephosphatweg eng.: pentose phosphate pathway
RI	Brechungsindex engl.: refractive index
rpm	Umdrehungen pro Minute engl.: revolutions per minute
RT	Raumtemperatur

Abkürzung	Bezeichnung
SHF	Separate Hydrolyse und Fermentation
SK	Schüttelkolben
SSF	Simultane Verzuckerung und Fermentation engl.: simultaneous saccharification and fermentation
STR	Rührkesselreaktor engl.: stirred tank reactor
SUC	Succinat
Tad1	trans-Aconitase
UV	ultraviolett
YEPS	Hefeextrakt-Pepton-Saccharose engl.: yeast extract-peptone-sucrose

Tabelle A.2 – Liste der verwendeten Formelzeichen.

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
0	[-]	Startpunkt
A	[mm ²]	Fläche
c	[g/L]	Konzentration
h	[mm]	Höhe
\bar{n}	[-]	Mittelwert
P	[-]	Produkt
Pr	[g/(L·h)]	Produktivität
S	[-]	Substrat
t	[h]	Zeit
$Y_{P/S}$	[w/w]	Ausbeute

A.2 Chemikalienliste

Tabelle A.3 – Liste der verwendeten Chemikalien und Standards.

Chemikalie	Reinheit	Lieferant
Aceton	≥ 99,9 %	Merck
cis-Aconitsäure	98 %	Sigma Aldrich
trans-Aconitsäure	99 %	Fluka
Ameisensäure 98-100 %	zur Analyse	Merck
Agar-Agar	für die Mikrobiologie	Merck
Ammoniaklösung 25 %	reinst	Fluka
Äpfelsäure	≥ 99 %	Carl Roth
Bernsteinsäure	zur Analyse	Fluka
Biogazyme 2x	Pulver, <i>T. reesei</i>	ASA Spezialenzyme
Bradfordreagenz		Sigma
Chloroform	≥ 99,8 %	Sigma Aldrich
3,5-Dinitrosalicylsäure	zur colorimetrischen Bestimmung reduzierender Zucker	Sigma Aldrich
meso-Erythritol	≥ 99 %	Sigma
Essigsäure 96 %	zur Analyse	Merck
Ethanol	96 %, reinst	Carl-Roth
Filterpapier	Whatman No. 1, 87 g/m ²	Sigma
Fumarsäure	zur Analyse	Alfa Aesar
Furfural	zur Analyse	Merck
Glycerin, wasserfrei	≥ 98 %	Carl Roth
Heneicosansäure	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	für die Mikrobiologie	Merck
n-Hexan	reinst	Merck
4-Hydroxybenzoesäure	99 %	Alfa Aesar
5-Hydroxymethylfurfural	≥ 98 %	Sigma Aldrich
K-Na-Tartrat · 4 H ₂ O	≥ 99 %, reinst	Merck
Kationentauscherharz	Dowex 50W-X8, 100/200-mesh	Sigma Aldrich
Ketoglutarinsäure	99 %	Riedel de Haën
KOH	zur Analyse	Merck
Lävulinsäure	zur Synthese	Merck



Chemikalie	Reinheit	Lieferant
Methanol	HPLC Ultra Gradient Grade	Carl Roth
Methylsulfonsäure	≥ 9,5 %	Sigma Aldrich
Natriumacetat wasserfrei	electrochemical grade	Thermo Fisher
Natriumcitrat		Sigma
Natriummetabisulfite	≥ 97 %	VWR
NaOH	zur Analyse	Merck
NaOH 50-52 %	in Wasser, für IC	Fluka
Natriumsulfat	wasserfrei	Fluka
Nilrot	technisch	Sigma
Pepton/Trypton	aus Casein	Carl Roth
Rinderserumalbumin	99 %	Sigma
Salpetersäure 69 %	Supra	Carl Roth
Schwefelsäure 0,5 M	Fixanal	Fluka
Schwefelsäure 72 %	zur Analyse	AppliChem
Schwefelsäure 98 %	98 %	Carl Roth
Syringaldehyde	98+ %	Alfa Aesar
Vanillin	reinst	AppliChem
Wasserstoffperoxid	30 %, Suprapur	Carl Roth
Salze		
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	zur Analyse, 99 %	Merck
CaCO ₃	gefällt	Carl Roth
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	zur Analyse	Merck
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	zur Synthese	Merck
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	rein	Merck
KCl	zur Analyse	Merck
KH ₂ PO ₄	zur Analyse, ≥ 99,5 %	Merck
NaCl	reinst, 99,5 %	Merck
NH ₄ Cl	zur Analyse	Merck
NH ₄ NO ₃	zur Analyse, ≥ 99 %	Fluka
NaNO ₃	zur Analyse	Merck
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	reinst, ≥ 99 %	Merck
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	rein, 98 %	Merck

Chemikalie	Reinheit	Lieferant
Zucker		
L-Arabinose	≥ 99 %, für die Biochemie	Carl Roth
D-Fructose	≥ 99 %, für biochemische Zwecke	Merck
D-Galactose	high purity grade	Amresco
Glucose· H ₂ O	für die Mikrobiologie	Carl Roth
D-Mannose	99 %	Alfa Aesar
L-Rhamnose· H ₂ O	99 %	Alfa Aesar
Saccharose	für die Mikrobiologie	Merck
D-Xylose	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Standards		
Anionen-Multielement-standard, 7 Anionen	in Wasser	Carl Roth
Kationen-Multielement-standard, 6 Kationen	in 0,1 % HNO ₃	Carl Roth
FAME-Mixstandard, 37 Komponenten	in Methylenchlorid	Sigma Aldrich
ICP-Multielement Standard, 28 Elemente	Rotistar 100 mg/L in 5 % HNO ₃	Carl Roth
Phosphat ICP-Standard	Rotistar 1000 mg/L in Wasser	Carl Roth
Schwefel ICP-Standard	Rotistar 1000 mg/L in Wasser	Carl Roth
Wolfram ICP-Standard	Rotistar 1000 mg/L in 4 % NH ₃	Carl Roth

A.3 Geräteliste

Tabelle A.4 – Auflistung der verwendeten Geräte, die zuvor nicht erwähnt wurden.

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Analytic A 200 S	Satorius AG, Göttingen
Autoklav	DX-23	SysTec GmbH, Linden
Autoklav	VX-40	SysTec GmbH, Linden
Kontaktthermometer	ETS-D5	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Kühlaggregat	WK450	MGW Lauda, Lauda-Königshofen
Inkubator	Minitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
	MR	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
mV-Meter	pH410	WTW, Weilheim
pH-Elektroden	InLab Micro	Mettler Toledo Inc., Columbus, USA
	405-DPAS-SC-K8S	Mettler Toledo Inc., Columbus, USA
pH-Meter	pH526	WTW, Weilheim
Photometer	T80	P.G. Instruments Ltd, Wibtuft, England
Reinstwasseranlage	MilliQplus 185	Merck KGaA, Darmstadt
Redox-Elektrode	Pt4805-DPAS-SC-K8S	Mettler Toledo Inc., Columbus, USA
Sauerstoffsensor	InPro 6800	Mettler Toledo Inc., Columbus, USA
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus GmbH, Hanau
Thermostat	RMG+RMS	MGW Lauda, Lauda-Königshofen
Trockenschränke	UE 400 230 V	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
	UT6420	Heraeus GmbH, Hanau
Vortexmischer	Genius3	IKA-Werke, Staufen im Breisgau



Gerät	Typ	Hersteller
Waage	EW 6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Biofuge stratos	Eppendorf AG, Hamburg Heraeus GmbH, Hanau

ANHANG B

Analysenergebnisse

B.1 Synthetische Hydrolysate

Tabelle B.1 – Zusammensetzung des synthetischen Weizenkaffhydrolysats nach Anders (2014).

Monosaccharid	Konzentration [g/L]
Glucose	37
Xylose	33
Arabinose	25
Galactose	7,5
Rhamnose	2,5

Tabelle B.2 – Zusammensetzung des synthetischen Orangenschalenhydrolysats.

Monosaccharid	Konzentration [g/L]
Glucose	39
Xylose	7
Arabinose	29
Galactose	22
Mannose	6

Tabelle B.3 – Zusammensetzung des synthetischen Zitterpappelhydrolysats nach Janga et al. (2011).

Monosaccharid	Konzentration [g/L]
Glucose	67,5
Xylose	26,5
Arabinose	0,7
Galactose	2,5
Mannose	2,7

Tabelle B.4 – Zusammensetzung des synthetischen Fichtenhydrolysats nach Sassner et al. (2008).

Monosaccharid	Konzentration [g/L]
Glucose	65
Xylose	9
Arabinose	3
Galactose	3
Mannose	20

B.2 Fettsäuren

Tabelle B.5 – Gebildete Fettsäuren der *Ustilago*-Stämme bei einer Kultivierung mit Glucose.

Fettsäure	<i>Ustilago maydis</i>	<i>Ustilago rabenhorstiana</i>
	DSM 17144	NBRC 8995
	[mg/g _{BTM}]	[mg/g _{BTM}]
Methylhexanoat (C6:0)	12,66	n.n.
Methyldodecanoat (C12:0)	6,09	n.n.
Methylmyristat (C14:0)	11,16	1,46
Methylpalmitat (C16:0)	64,48	30,04
Methylpalmitoleat (C16:1)	15,06	1,55
Methylstearat (C18:0)	12,78	16,94
Methylelaidinat (C18:1n9trans)	117,9	1,83
Methylinolenat (C18:2n6trans)	103,12	48,38
Methylarachinoat (C20:0)	8,12	n.n.
cis-8,11,14- Eicosatriensäure- methylester (C20:3n6)	7,75	n.n.
Methylbehenat (C22:0)	12,96	4,42
Methyltetracosanoat (C24:0)	2,83	2,45



B.3 Ammoniaklösungen

Tabelle B.6 – Spurenelemente in 6,25 % (v/v) Ammoniaklösungen.

Element	Wellenlänge	Rotipuran, Carl Roth [mg/L]	ultra trace, Fluka [mg/L]	ACS Reagenz, Sigma-Aldrich [mg/L]
Ag	328 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Al	396 nm	0,0381	0,0725	0,7706
As	189 nm	n.n.	n.n.	n.n.
B	249 nm	n.n.	0,0001	1,93
Ba	455 nm	0,0013	0,0019	0,0056
Be	234 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Bi	223 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Ca	422 nm	0,0375	n.n.	0,0156
Cd	214 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Co	228 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Cr	267 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Cu	324 nm	n.n.	n.n.	0,0006
Fe	259 nm	n.n.	0,0094	0,0194
K	766 nm	3,06	2,53	2,95
Li	670 nm	n.n.	0,0019	0,0575
Mg	280 nm	0,0013	0,0006	0,0031
Mn	293 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Mo	202 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Na	589 nm	0,1681	0,1843	79
Ni	231 nm	n.n.	n.n.	n.n.
P	177 nm	0,87	0,58	0,49
Pb	220 nm	n.n.	0,0013	0,0019
S	182 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Sb	217 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Se	203 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Sr	407 nm	n.n.	n.n.	0,0013
Ti	337 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Tl	190 nm	n.n.	n.n.	n.n.
W	239 nm	n.n.	n.n.	n.n.
Zn	206 nm	n.n.	n.n.	0,0156

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses aktuellen und interessanten Themas sowie für die Betreuung. Vor allem anregende Diskussionen, seine Ratschläge und seine Offenheit gegenüber neuen Ideen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Adrian Schumpe für die Übernahme des Koreferates und Herrn Prof. Dr. Udo Rau für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. Anja Kuenz, Frau Dr. Antje Hevekerl und Herrn PD Dr. Ulf Prüße bin ich sehr dankbar für die effektive und enge Zusammenarbeit, tief gehende Diskussionen und die Bereitschaft mir stets bei allen Fragen und Problemen zur Seite zu stehen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Thünen-Instituts für Agrartechnologie für die gute Arbeitsatmosphäre. Ich möchte mich im Einzelnen bei Dr. Nico Anders, Frank Brandes, Martin Ciaston, Sophia Dietel, Laslo Eidt, Marina Heuer, Heike Horn, Dennis Jäger, Dr. Norman Kaufmann, Johannes Paas, Doris Steinkraus, Dr. Henning Storz, Linda Teevs, Eric Weingart und Dr. Thomas Willke bedanken. Ein sehr großes Dankeschön gilt Malee Kallbach und Dr. Silvia Klotz, die mir in den guten und weniger guten Phasen dieser Promotion immer zur Seite gestanden haben.



Herrn Dr. Wolfgang Maier (Julius Kühn-Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung verschiedener *Ustilaginaceae*-Stämme.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Stefanie Kaul, Karolin Schön, Ansgar Brockmann, Tatevik Ghazaryan, Laslo Eidt, Janine Mayer, Jan Jasper, Andreas Wersthofen und Malin Lünsmann, die im Rahmen eines Praktikums, einer Studien-, Bachelor- oder Masterarbeit maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke an Annika, Mareike, Wiebke und Nadine sowie an die Mädels der HSG Braunschweig. Die gemeinsame Zeit hat immer dazu beigetragen, wieder einen klaren Kopf zu bekommen und mich aufzubauen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern, Doris und Tobias für die liebevolle Unterstützung, Motivation und Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Et hätt noch immer jot jejange – Danke!



