



Deutsche  
Bundesstiftung Umwelt



Abschlussbericht  
zum Vorhaben

**„Entwicklung eines umweltfreundlichen  
Bioverfahrens zur Gewinnung von Carotinoiden mit  
In-situ Produktisolierung (BioCar)“**

AZ 34643/01

Zuwendungsempfänger: Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH– UFZ  
Department Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum  
Permoserstraße 16; 04318 Leipzig

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2019 bis 31.03.2021

Projektleiter: Dr. Andreas Aurich

Verfasser: M.sc. Thomas Papert

Datum: 29.06.2021

## Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung.....	8
2. Anlass und Zielsetzung des Projektes .....	8
2.1 Aufgabenstellung/Anlass .....	8
2.2. Ziel und Gegenstand des Projektvorhabens.....	9
3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden .....	9
3.1. Kulturmedium .....	9
3.2. Zellzahlbestimmung .....	10
3.3. Biotrockenmassebestimmung.....	11
3.4. Gesamt-Lipidbestimmung .....	11
3.5. Carotinoidbestimmung .....	12
3.5.1. Probenvorbehandlung.....	12
3.5.2. Carotinoidextraktion .....	12
3.5.3. Quantitative Carotinoidbestimmung mittels Photometer.....	12
3.5.4. Quantitative Carotinoidbestimmung mittels HPLC.....	14
3.6. Quantitative Bestimmung der Anionen und Kationen mittels Ionenchromatographie .....	15
3.7. Bestimmung der Glucose- und Glycerinkonzentration .....	15
3.7.1. Glucosekonzentration.....	15
3.7.2. Glycerinkonzentration.....	16
4 Ergebnisse.....	17
4.1. Ermittlung effizienter Limitationsbedingungen für die Carotinoidbildung (AP. 1) .....	17
4.2. Festlegung geeigneter Kohlenstoffquellen und Substitution konventioneller Extraktionsmittel durch Speiseöle (AP 2) .....	22
4.3. Bestimmung der Konzentrationsunterschiede von Kationen/Anionen in der Extraktionsphase und der wässrigen Phase (AP 3) .....	25
4.4. Bestimmung optimaler Medienbedingungen für die Produktbildung und- freisetzung (AP 4)....	28
4.4.1. Optimierung des Gehaltes der anorganischen Medienkomponenten.....	28
4.4.2. Substitution komplexer Medienbestandteile (z.B. Hefeextrakt, Maisquellwasser) .....	31
4.4.3. Der Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Membrandiffusionsvorgänge .....	32
4.4.4. Kultivierungen mit Rohglycerol und weitere preiswerte Nebenstoffströme der Biodieselindustrie (Glycerolphase).....	33
4.4.5. Optimierung der Mono- und Mischsubstratkultivierung der ausgewählten Hefen oder Pilze .....	34
4.5. Ermittlung der apparativen und verfahrenstechnischen Bedingungen für die Maßstabsübertragung (AP 5).....	36
4.6. Bioprozessentwicklung/ Bioprozessführung mit In-Situ Produktgewinnung (AP. 6).....	37
4.6.1. Ermittlung der optimalen Temperatur zur In-Situ-Produktgewinnung.....	37
4.6.2. Untersuchung zu möglichen Auswirkungen auf die Produktbildung durch gezielte Temperaturänderung (Temperaturshift).....	38
4.6.3. Ermittlung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum und der Produktsynthese .....	39
4.6.4. Ermittlung des spezifischen Leistungseintrages und der Einflussgröße Gelöstsauerstoffkonzentration (pO <sub>2</sub> ) in Abhängigkeit der Begasungsrate .....	41
4.6.5. Ermittlung des optimalen Zeitpunkts der Zugabe von Extraktionsmittel zur In-Situ-Produktisolierung.....	45
4.7. Produktaufarbeitung (Biomassephase, Lösungsmittelphase, Kristalle) (AP 7).....	47

5. Diskussion .....	48
6. Öffentlichkeitsarbeit .....	50
7. Fazit .....	50
8. Anhang .....	51

**Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1. Darstellung der Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Massenanteile (%) unter definierten Kultivierungsbedingungen und Nährstofflimitationen bei *Rh. sphaerocarpum* (A), *Rh. toruloides* (B), *B. trispora* (+) (C) und *B. trispora* (-) (D). 19
- Abbildung 2. Gegenüberstellung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration und  $\beta$ -Carotin-Konzentration der Monokultivierung von *B. trispora* (-), *B. trispora* (+), *B. trispora* (+) u. (-), *Rh. toruloides* und *Rh. sphaerocarpum* unter Eisen-Stickstoffmangel und der Mischkultur bestehend aus *B. trispora* (+) und (-). 20
- Abbildung 3. Darstellung der ermittelten Zellzahlen (Links) und der Verlauf des Zellwachstums (Rechts) von *Rh. sphaerocarpum* bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Eisen während des Versuchszeitraums. 21
- Abbildung 4. Darstellung der erreichten Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Massenanteile bei der *Blakeslea trispora*-Kultivierung [%] mit wasserlöslichen Substraten/Sonnenblumenöl (SÖl) (Links) und Glycerol (Gly) mit nativen Ölen (Rechts). 23
- Abbildung 5. Grafische Darstellung der photometrisch ermittelten Carotinoid-Konzentrationen in der Ölphase zum Versuchsende (117 h) ohne Anwendung des In-situ-Verfahren. 24
- Abbildung 6. Gegenüberstellung der gewonnenen carotinoidhaltigen Ölphasen zum Versuchsende zu den ursprünglich eingesetzten Ölen zum Versuchsbeginn. 1: Links: Sonnenblumenöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Sonnenblumenöl zum Versuchsende; 2: Links: Rapsöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Rapsöl zum Versuchsende; 3: Links: Olivenöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Olivenöl zum Versuchsende; 4: Links: Sojabohnen-Öl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Sojabohnen-Öl zum Versuchsende; 5: Links: Biodiesel (FAME) zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: FAME zum Versuchsende; 25
- Abbildung 7. Darstellung der erreichten Carotinoid-Konzentration und  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Biomasse, die Konzentration an Carotinoiden in der Ölphase (Links) sowie Gesamt-Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Masseanteile (Rechts) zum Versuchsende ohne N-Zugabe, mit einmaliger und zweimaliger N-Zugabe (In-situ). 29
- Abbildung 8. Darstellung der Carotinoid-,  $\beta$ -Carotin-Konzentration (Biomasse) und der Carotinoid-Konzentration in der Ölphase (extrazellulär) (Links) sowie die erreichten Carotin-Massenanteile in der Biomasse (Rechts) zum Kultivierungsende bei unterschiedlichen Phosphat-Ausgangs-Konzentrationen. 30
- Abbildung 9. Grafische Gegenüberstellung der Kultivierungsansätze mit Hefeextrakt (1), Harnstoff (2), Ammoniumsulfat (3) und Kaliumnitrat (4) nach 48 h Kultivierungszeit. 32
- Abbildung 10. Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen in der Ölphase ohne und mit Zugabe von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium. 33
- Abbildung 11. Darstellung des Wachstumsverhaltens der *Blakeslea trispora* Halbstämme. 1: *B. trispora* (-) auf Rohglycerol; 2: *B. trispora* (-) auf Glycerolwasser; 3: *B. trispora* (+) auf Rohglycerol; 4: *B. trispora* auf Glycerolwasser nach einer Kultivierungszeit von 48 h. 33
- Abbildung 12. Darstellung der ermittelten Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Biomasse und in der Ölphase mit den Zusätzen Thiamin x HCl, Mangan und Vitamin B12 nach 119 h Kultivierungszeit. 34

- Abbildung 13. Darstellung der Resultate aus den Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Volumen-Verhältnissen zwischen der wässrigen Phase und der Extraktionsphase. 35
- Abbildung 14. Bildliche Gegenüberstellung des Pilzwachstums, Links: 1 L Multifors-Glasreaktor; Rechts: 1 L Blasensäulenreaktor 36
- Abbildung 15. Links: Darstellung der ermittelten massebezogenen Ausbeuten an Carotinoiden und  $\beta$ -Carotin; Rechts: Darstellung der ermittelten Gesamt-Carotinoid-Konzentration im Extraktionsmittel zum Versuchsende (214h). 37
- Abbildung 16. Darstellung der Pilzmorphologie während des Kultivierungsprozesses. Links: Temperaturshift von 28 °C auf 22 °C; Rechts: Temperaturshift von 28 °C auf 16 °C. 38
- Abbildung 17. Darstellung des Verlaufes der Konzentration an lösliche Stärke (Links) und vom Phosphat- (Rechts) im Versuchszeitraum von 119 h bei unterschiedlichen pH-Werten. 39
- Abbildung 18. Mikroskopische Aufnahmen von Carotinoid-Kristallen im Pilzmyzel mit unterschiedlicher Farbgebung gelöst in Extraktionsmittel oder frei im Myzel vorliegend. 40
- Abbildung 19. Darstellung der Substratverbrauchsrate von *B. trispora* mit und ohne Schikanen im Schüttelkolben bei einer Schüttelfrequenz von 145 rpm und einer Kultivierungstemperatur von 22°C bis zum Versuchsende (190 h). 42
- Abbildung 20. Darstellung der Ausbeuten an Gesamt-Carotinoiden im Pilzmyzel und die Carotinoid-Konzentration im Extraktionsmittel (Sonnenblumenöl) bei unterschiedlichen Begasungsraten. 43
- Abbildung 21. Darstellung eines typischen Kurvenverlaufes vom Sauerstoffgehalt im Blasensäulensystem bei einer Begasungsrate von 2,0 vvm bei der Kultivierung der (+) und (-) *Blakeslea trispora* Halbstämme über den Versuchszeitraum von 167 h. 44
- Abbildung 22. Vergleich der Biomasseausbildung im Reaktorsystem ohne Extraktionsmittel (Links) und mit Extraktionsmittel (Rechts) von Versuchsbeginn an. 46

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der im Projektvorhaben verwendeten Mikroorganismen.	9
Tabelle 2. Darstellung der Medienzusammensetzung für die Bestimmung einer geeigneten Limitation bei einer Monokultivierung ( <i>Rh. sphaerocarpum</i> , <i>Rh. toruloides</i> , <i>X. dendrorhous</i> , <i>B. trispora</i> (+) und <i>B. trispora</i> (-)) und Mischkultivierung (ausschließlich <i>B. trispora</i> (+) und (-)).	10
Tabelle 3. Veränderung der Eluenten-Zusammensetzung während der Kalibrierung und der Probenmessungen.	14
Tabelle 4. Darstellung der verwendeten Methoden zur Bestimmung der Anionen- und Kationenkonzentration.	15
Tabelle 5. Darstellung der Ausgangskonzentrationen von Anionen, Kationen und Vitaminen zur Ermittlung einer effizienten Limitation.	17
Tabelle 6. Darstellung der ermittelten Konzentrationen an Anionen und Kationen unter verschiedenen Limitationsbedingungen bei der Hefe <i>Rh. sphaerocarpum</i> zum Versuchsende.	18
Tabelle 7. Darstellung der ermittelten Ergebnisse aus den Limitationsversuchen mit Monokulturen und einer Mischkultur bestehend aus <i>B. trispora</i> (+) und (-)	20
Tabelle 8. Darstellung der Resultate aus den Limitationsversuchen mit unterschiedlichen Eisenstartkonzentrationen ohne Berücksichtigung der Konzentration an Eisen aus der Vorkultur.	22
Tabelle 9 tabellarische Auflistung der erreichten Carotinoid und $\beta$ -Carotin-Massenanteile aus der Pilzbiomasse mit wasserlöslichen Substraten/SÖl und Glycerol mit nativen Ölen.	24
Tabelle 10. Darstellung des ausgeführten Versuchsschemas.	26
Tabelle 11. Darstellung der relativen Standardabweichung von Anionen und Kationen bei identischen Medium und unterschiedlichen Temperaturen, Drehzahlen und pH-Werten gegenüber dem Ausgangsmedium.	27
Tabelle 12. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen und Carotinoid-Massenanteile sowie die Biomasse-Konzentration und Produktivität bei unterschiedlichen Variationen der Hefeextrakt-Konzentration ohne und mit In-situ-Verfahren.	29
Tabelle 13. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Ausbeuten bezogen auf die Biomasse-Konzentration bei unterschiedlichen Variationen der Hefeextrakt-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.	30
Tabelle 14. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen und Carotinoid-Massenanteile sowie die Biomasse-Konzentration und Produktivität bei unterschiedlichen Variationen der Phosphat-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.	31
Tabelle 15. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Ausbeuten bezogen auf die Biomasse-Konzentration bei unterschiedlichen Variationen der Phosphat-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.	31
Tabelle 16. Auflistung der erreichten massebezogenen Carotinoidausbeuten und der Konzentration an Carotinoiden im Extraktionsmittel bei unterschiedlichen C-Quellen-Einsatz.	37
Tabelle 17. Auflistung der ermittelten massebezogenen Carotinoid-Ausbeuten und der Konzentration an Carotinoiden im Extraktionsmittel nach einem definierten Temperatur-shift.	39

Tabelle 18. Darstellung der Produktausbeuten an Carotinoiden bei unterschiedlichen pH-Werten während der Produktsynthese in <i>Blakeslea trispora</i> .	40
Tabelle 19. Darstellung der Resultate aus den Versuchsansätzen mit <i>B. trispora</i> ohne und mit eingebauten Schikanen im Schüttelkolben.	42
Tabelle 20. Darstellung der massebezogenen Produktausbeuten und der Gesamt-Carotinoid-Konzentration in der Extraktionsphase bei unterschiedlichen Begasungsraten.	43
Tabelle 21. Auflistung der berechneten spez. Leistungseinträge für unterschiedliche Begasungsraten im verwendeten Blasensäulensystem.	45
Tabelle 22. Darstellung der erreichten Carotinoid- und $\beta$ -Carotin-Massenanteile in der Biomasse und der Konzentration an Carotinoiden in der Extraktionsphase.	47
Tabelle 23. Voreingestellte Ablaufbedingungen der Gefriertrocknung	51

## 1. Kurzfassung

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines innovativen umweltfreundlichen Bioverfahrens zur Gewinnung von Carotinoiden mit In-situ-Produktisolierung. Im Rahmen der Forschungs- und Entwicklungsarbeiten soll ein Bioprozess entwickelt werden, welcher eine Direktisolierung von biologischen Farbstoffen durch Kultivierung in einem Mehrphasensystem erlaubt. Dabei soll ferner gezeigt werden, dass schwer zugängliche Produkte wie Carotinoide, vom Organismus abgegeben und neu intrazellulär synthetisiert werden können. Die eingesetzte lipophile Phase soll gleichzeitig als Substratphase fungieren, sodass parallel zur Produktausschleusung durch den Mikroorganismus, ein Konzentrationsanstieg des Zielproduktes in der Substratphase vonstattengeht. Eine mögliche Übersättigung der Substratphase, gekennzeichnet durch Auskristallisation des Zielproduktes, soll im Forschungsvorhaben mit betrachtet werden.

Dabei stellt die Auswahl geeigneter Carotinoidproduzenten eine Voraussetzung für die In-situ-Produktisolierung dar. Eine Vorauswahl geeigneter Mikroorganismen wurde auf Basis der Auswahlkriterien Produktivität, Zusammensetzung der Speicherstoffe, Anpassungsfähigkeit an Umgebungs- und Milieubedingungen, Pathogenität gegenüber Säugetieren und der Umwelt sowie die Kultivierbarkeit das Handling der Mikroorganismen durch weitreichende Literaturrecherchen mit Nutzung von Online-Datenbanken und Online-Katalogen vorgenommen.

## 2. Anlass und Zielsetzung des Projektes

### 2.1 Aufgabenstellung/Anlass

Das aktuelle Forschungsprojekt hat den Anspruch, Lösungen zu den grundlegenden Zielen des seit Juni 2015 aktuellen Förderprogramms „Nachwachsende Rohstoffe“ des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) sowie den Zielen und Leitgedanken der nationalen Nachhaltigkeitsstrategie, der Politikstrategie Bioökonomie, dem deutschen Ressourceneffizienzprogramm (ProgRess) und der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) bereitzustellen. So wird beispielhaft ein Beitrag zur nachhaltigen Produktion von Industrie- und Konsumgütern durch die Nutzung biogener Rohstoffe geleistet. Eine effiziente und umweltschonende Ressourcennutzung durch Vermeidung des Einsatzes von erdölbasierenden Lösungsmitteln und die Verbesserung der einheimischen Wettbewerbsfähigkeit, nachhaltige Schonung von Erdöl- und Wasserressourcen, das Konzept der Recycling und der Kaskadennutzung biogener Ressourcen sowie die Entwicklung von umsetzbaren Nachhaltigkeitskonzepten werden angesprochen.

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Entwicklung und Etablierung eines Carotinoid-Produktionsverfahrens, welches die parallele Gewinnung von Carotinoiden in der Biomasse und in der zugegebenen Extraktionsphase ohne vorhergehenden Zellaufschluss mit sukzessiver Produktneusynthese erlaubt.



## 2.2. Ziel und Gegenstand des Projektvorhabens

Ziel des Projektvorhabens war die Entwicklung eines Bioverfahrens zur Gewinnung von Carotinoiden mit In-situ-Produktisolierung mit den Schwerpunkten:

- Ermittlung effizienter Limitationsbedingungen für die Carotinoidbildung (**AP 1**)
- Festlegung geeigneter Kohlenstoffquellen und Substitution konventioneller Extraktionsmittel durch Speiseöle (**AP 2**)
- Bestimmung der Konzentrationsunterschiede von Kationen/Anionen in der Extraktionsphase und der wässrigen Phase (**AP 3**)
- Bestimmung optimaler Medienbedingungen für die Produktbildung und- freisetzung (**AP 4**)
- Ermittlung der apparativen und verfahrenstechnischen Bedingen für die Maßstabsübertragung (**AP 5**)
- Entwicklung des Bioprozesses/-führung mit In-Situ-Produktgewinnung (**AP 6**)
- Untersuchungen zur Produktaufbereitung (**AP 7**)

## 3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die im Forschungsprojekt verwendeten Hefen und Pilze, welche als potentielle Kandidaten zur Carotinoid-Akkumulierung mit gleichzeitiger extrazellulärer Gewinnung des Zielproduktes eingestuft wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Auflistung der im Projektvorhaben verwendeten Mikroorganismen.**

<b>Hefen:</b>
<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i> H517 (=MUCL 30455) Synonym: <i>Rhodotorula glutinis</i> (Typstamm)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> H516 (=MUCL 30250) Synonym: <i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (=DSM-5626)
<b>Pilze:</b>
<i>Blakeslea trispora</i> (=DSM-2387)
<i>Blakeslea trispora</i> (=DSM-2388)

### 3.1. Kulturmedium

Für die Limitationsuntersuchungen wurde das in der Tabelle 2 dargestellte Kulturmedium verwendet. Das Substrat Sonnenblumenöl wurde bei 80 °C für 20 min. pasteurisiert. Thiamin x HCl, Eisensulfat und die Bestandteile der Spurensalze sind hitzelabil und wurden unmittelbar vor der Medienzusammenstellung steril filtriert und zugegeben. Zur Vermeidung einer Maillard-Reaktion wurde die C-Quelle Glucose getrennt von den restlichen Medienkomponenten bei 121 °C für 20 min. dampfsterilisiert.

**Tabelle 2. Darstellung der Medienzusammensetzung für die Bestimmung einer geeigneten Limitation bei einer Monokultivierung (*Rh. sphaerocarpum*, *Rh. toruloides*, *X. dendrorhous*, *B. trispora* (+) und *B. trispora* (-)) und Mischkultivierung (ausschließlich *B. trispora* (+) und (-)).**

Substanz	<i>Rh. sphaerocarpum</i> <i>Rh. toruloides</i>	<i>X. dendrorhous</i>	<i>B. trispora</i> (+) und (-) (Monokult.)	<i>B. trispora</i> (+) und (-) (Mischkultur)	Einheit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00	1,00	0,5	0,5	g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,25	1,25	0,78	0,92	g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	1,80	1,80	0,027	-	g L <sup>-1</sup>
NaCl	-	-	0,035	-	g L <sup>-1</sup>
Thiamin x HCl	0,0010	0,0010	0,00	0,001	g L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,0064	0,0064	0,0064	-	g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	-	-	-	7,5	g L <sup>-1</sup>
<b>Spurensalze</b>					
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,05	0,05	0,05	-	mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0309	0,0309	0,0309	-	mg L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,012	0,012	0,012	-	mg L <sup>-1</sup>
CoSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,0235	0,0235	0,0235	-	mg L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,0124	0,0124	0,0124	-	mg L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,0143	0,0143	0,0143	-	mg L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0,0184	0,0184	0,0184	-	mg L <sup>-1</sup>
Sonnenblumenöl	60,00	60,00	60,00	60	g L <sup>-1</sup>
Glucose	-	-	30,00	30	g L <sup>-1</sup>

### 3.2. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Hefezellzahl wurde unmittelbar nach den Probenahmen mit einer Neubauer-Zählkammer mittels Lichtmikroskop Axiostar (Fa. ZEISS) durchgeführt. Dabei wurden neben der Zellzahl der morphologische Zustand und die Zellgröße betrachtet. Durch die mikroskopischen Untersuchungen konnten zudem unerwünschte Einflussfaktoren auf den biologischen Prozess wie mikrobielle Fremdkontamination oder Kristallisation von Medienbestandteilen detektiert werden.

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine saubere und trockene Zählkammer (Kammertiefe = 0,1 mm für Hefezellen und < 0,1 mm für Bakterien und Sporen) und Deckgläschen verwendet. Das Deckgläschen wurde auf den Seitensteg der Zählkammer aufgelegt sodass die newtonschen Ringe durch Lichtbrechung (Interferenzen) sichtbar wurden. Die homogene Probe (10 µL Probe) wurde luftblasenfrei in die Zählkammer pipettiert und zur statistischen Sicherheit die Zellzahl durch eine Doppelbestimmung (2 Zählungen) erfasst. Die Zellzahl pro Milliliter wurde nach der Zählung mittels der Gleichung 1 bestimmt.

$$\text{Zellen mL}^{-1} = \frac{\text{Summe aller Zellen in den ausgezählten Großquadraten} \cdot 1000 \cdot \text{VF}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate} \cdot \text{Anzahl Kleinquadrate pro Großquadrate} \cdot \text{Kleinquadratfläche} \cdot \text{Kammertiefe}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

VF=Verdünnungsfaktor  
Kleinquadratfläche in mm<sup>2</sup>  
Kammertiefe in mm

### 3.3. Biotrockenmassebestimmung

Ein trockener RC-Filter ( $m_1$ ) (Membran Filter Regenerate Cellulose Whatman, Fa. GE Healthcare) wurde auf einer Feinwaage (Typ: BP221-S, Fa. Sartorius AG) ausgewogen und vor der Probenaufgabe auf einen Keramikfilter gelegt. Mittels Glasaufsatz und einer Befestigungsklammer wurde der RC-Filter fixiert und mit bi. dest. H<sub>2</sub>O befeuchtet. Das Ganzglas-Vakuumfiltrationsgerät der Firma Sartorius AG wurde gestartet. Ein Unterdruck unterhalb des Keramik und RC-Filters stellt sich ein, sodass der flüssige Bestandteil in ein Auffanggefäß gesogen wurde. Auf den RC-Filter wurden langsam 5 mL ( $V_{Probe}$ ) der homogenisierten Probe mittels Pipette aufgegeben. Zur Vermeidung von Probenrückstände in der Pipette wurde diese mit 5 mL mit bidest. H<sub>2</sub>O gefüllte und als ersten Waschschrift auf den RC-Filter langsam pipettiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Darauf folgend wurde die sich auf den RC-Filter befindenden Biomasse mit jeweils 1 mL Aceton (drei Aceton-Waschschrift insgesamt) gespült. Dies hatte die Entfernung der extrazellulären Ölphase zur Folge. Das Vakuum wurde für 5 min. konstant gehalten und anschließend der RC-Filter mit Probe auf eine Aluminiumschale überführt. Das Trockengewicht des RC-Filters mit Probe ( $m_2$ ) wurde mittels Feuchtebestimmer (MA45) der Firma Sartorius AG gemessen. Die Biotrockenmasse der Probe wurde nach Gleichung 2 berechnet.

$$\text{Biotrockenmasse (BTS)} = \frac{(m_2 - m_1)}{V_{Probe}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$m_1$  = Masse des trockenen Filters [g]

$m_2$  = Masse des Filters und der Probe nach der Trocknung [g]

$V_{Probe}$  = Probenvolumen [L]

### 3.4. Gesamt-Lipidbestimmung

Für die Bestimmung des Lipid-Gehaltes der trockenen Biomasse wurde die SOX THERM/Multistat (Gerhardt GmbH & Co. KG) verwendet. Die durch die Gefriertrocknung (Typ: Gamma 2-16 LSCplus, Fa. CHRIST) vollständig entwässerte Probe wurde in eine fettfreie und trockene Extraktionshülse (Fa. GE Healthcare) mittels Feinwaage eingewogen ( $m_{Einwaage}$ ) und das Gewicht notiert. Die mit der Probe bestückte Extraktionshülse wurde in einen Extraktionshülsenhafter eingesetzt. Beides wurde darauffolgend in einen sauberen, trockenen, fettfreien und vorher ausgewogenen Extraktionsbehälter ( $m_1$ ), welcher vorher für 1 bis 3 h bei 105 °C getrocknet und anschließend zur Abkühlung im Exsikkator gelagert wurde, überführt. Vor dem wiegen des Extraktionsbehälters wurden 5 bis 6 Siedesteine (J.P. Pöllath - Labor-Technologie) zugegeben und anschließend mittels Feinwaage das Gewicht bestimmt. In den Extraktionsbecher wurden vorsichtig 140 mL des Lösungsmittels Petroleumbenzin (CHEMSOLUTE®, Fa. Th. Geyer) mittels sauberen und fettfreien Glasmesszylinder zugegeben. Über die Multistat-Steuereinheit wurde der Extraktionsvorgang gestartet. Nach dem Programmende wurde der Extraktionsbecher in einem Trockenschrank (105 °C) mit Luftabzug, zur Entfernung von Lösungsmittelrückständen, für 24 h gelagert. Vom Extraktionsbecher (ohne Extraktionshülse und Extraktionshülsenhafter) wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur im Exsikkator das Gewicht ( $m_2$ ) ermittelt. Der in der Biomasse enthaltene prozentuale Lipidgehalt wurde mit der Gleichung 3 berechnet.

$$\omega = \frac{m_2 - m_1}{m_{\text{Einwaage}}} * 100 \% \quad [\%] \quad (\text{Gleichung 3})$$

$m_1$  = Masse des leeren, getrockneten Extraktionsbechers (mit Siedesteinchen) in [g]

$m_2$  = Masse des Extraktionsbechers (mit Siedesteinchen) mit Lipide/Fette nach der Trocknung [g]

$m_{\text{Einwaage}}$  = Masse der eingewogenen Probe [g]

### 3.5. Carotinoidbestimmung

#### 3.5.1. Probenvorbereitung

Die während des Kultivierungsvorganges oder unmittelbar nach Beendigung des Versuches entnommene Probe wurde in einem 50 mL Falcon-Tube überführt und bei 9900 rpm für 5 min. zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Fa. Eppendorf). Die aufschwimmende Ölphase wurde in ein Mikroreaktionsgefäß mittel Pipette zur weiteren Untersuchung überführt. Die wässrige Phase wurde vom Biomassepellet getrennt und kühl gelagert. Es war darauf zu achten, dass keine Ölphase an den Falcon-Tube-Seitenwänden zurück blieb. Zur Carotinoid-Bestimmung wurde das Biomassepellet bei -40°C (Typ: Mediline, Fa. Liebherr) eingelagert. Nach dem vollständigen Gefrieren des Biomassepellets wurden die Proben einer Sublimationstrocknung unterzogen. Dazu wurden die gefrorenen Proben für 12 h nach einem vorher eingegebenen Ablaufschema (siehe Anhang) lyophilisiert (Typ: Gamma 2-16 LSCplus, Fa. CHRIST).

#### 3.5.2. Carotinoidextraktion

Von dem wasserfreien Biomassepellet wurden zwischen 0,025 bis 0,06 g in einem trockenen und fettfreien 2 mL Mikroreaktionsgefäß mittels Feinwaage (Typ: BP221-S, Fa. Sartorius AG) eingewogen und das genaue Einwaage-Gewicht notiert ( $m_{\text{Einwaage}}$ ). Zu der Probe wurden 0,5 g Kalk-Soda-Glasperlen (Fa. Th. Geyer) mit einem Durchmesser von 1,7 bis 2,0 mm und als Extraktionsmittel 1,3 mL Aceton (Aceton ROTISOLV® HPLC, Fa. Roth) ( $V_{\text{Lösungsmittel}}$ ) zugegeben. Der mechanische Zellaufschluss wurde mit einer Schwingmühle der Firma Retsch GmbH vorgenommen. Dafür wurden die vorbereiteten Proben in die Probenhalterung der Schwingmühle geschoben und fixiert. Dem folgend wurden die Proben für 5 min. bei 30 s<sup>-1</sup> zugleich aufgeschlossen und homogenisiert. Die behandelte Probe wurde für 3 min. bei 13200 rpm (Typ: Centrifuge 5415D, Fa. Eppendorf AG) zentrifugiert und anschließend das partikelfreie Carotinoid-Aceton-Gemisch vorsichtig mittels Pipette in ein trockenes und fettfreies Mikroreaktionsgefäß (2 mL) überführt.

#### 3.5.3. Quantitative Carotinoidbestimmung mittels Photometer

Zur quantitativen Bestimmung der gesamt-Carotinoid-Konzentration in der getrockneten und aufgeschlossenen Biomasse und der gewonnenen Ölphase wurde das Photometer Ultrospec 3100 pro der Firma Amersham BioSciences UK Ltd. eingesetzt. Als Kalibrierstandard wurde  $\beta$ -Carotin (Th. Geyer) und trans-Astaxanthin (aus *Blakeslea trispora*, Th. Geyer) verwendet. Die Kalibrierstandards wurden mittel Feinwaage eingewogen und in 10 mL des jeweiligen Lösungsmittel (Aceton ROTISOLV® HPLC der Fa. Roth und Sonnenblumenöl der Fa. Ölmühle Bobritzsch) gelöst. Für die Messungen mit Aceton als Lösungsmittel, wurden Quarzküvetten verwendet. Zur Ermittlung der Gesamt-Carotinoid-

Konzentration in der Ölphase kamen 1,5 mL Halbmicro-Kunststoffküvetten (Fa. Brand GmbH) zum Einsatz. Durch einen Wellenlängenscan konnte ein Extinktionsmaximum ( $E_1$ ) für  $\beta$ -Carotin bei 450 nm (Aceton) und 462 nm (Sonnenblumenöl) sowie für Astaxanthin bei 480 nm (Aceton) und 486 nm (Sonnenblumenöl) bestimmt werden (siehe Anhang)

### 3.5.3.1. Quantitative Carotinoidbestimmung der Biomasse mittels Photometer

Zur Ermittlung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration wurde das Carotinoid-Aceton-Gemisch in einer 3 mL Quarzküvette verdünnt und homogenisiert, sodass ein Extinktionswert von 1,0 nicht überschritten wurde. Die Extinktion der Probe wurde je nach eingesetztem Lösungsmittel (Aceton, Sonnenblumenöl) gegen einen Blindwert ermittelt. Der Trübheitsanteil bei einer Wellenlänge von 700 nm ( $E_2$ ) wurde detektiert und bei der Berechnung mit einbezogen. Mit der Gleichung 4 wurde die Gesamt-Carotinoid-Konzentration berechnet, welche in den 1,3 mL Aceton gelöst war.

$$C_{\text{Carotin}} = \frac{(E_1 - E_2) \cdot VF}{0,0501} \text{ [mg L}^{-1}\text{]} \quad (\text{Gleichung 4})$$

$E_1$  = Extinktion bei 450 nm

$E_2$  = Extinktion bei 700 nm

VF = Verdünnungsfaktor

Aus der Probeneinwaage ( $m_{\text{Einwaage}}$ ), dem verwendeten Lösungsmittelvolumen und der Carotinoid-Konzentration (Gleichung 4) wurde rechnerisch der prozentuale Carotinoid-Massenanteil ermittelt (Gleichung 5).

$$\omega = \frac{c_{\text{Carotin}} \cdot V_{\text{Lösungsmittel}}}{1000 \cdot m_{\text{Einwaage}}} \cdot 100\% \text{ [%]} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$\omega$  = prozentualer Carotinoid-Anteil [%]

$V_{\text{Lösungsmittel}}$  = 0,0013 L

1000 = Umrechnungsfaktor von  $\text{mg L}^{-1}$  auf  $\text{g L}^{-1}$

$m_{\text{Einwaage}}$  = Masse der Einwaage [g]

Die tatsächliche Gesamt-Carotinoid-Konzentration pro Liter wurde durch Multiplikation der Biotrockenmasse mit dem Carotinoid-Massenanteil ermittelt.

$$c_{\text{Carotinoid}} = BTM \cdot \left( \frac{\omega}{100\%} \right) \cdot 1000 \text{ [mg L}^{-1}\text{]} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Die Gesamt-Carotinoid-Produktivität wurde mit Hilfe der Gleichung 7 berechnet.

$$\text{Produktivität}_{\text{Carotinoid}} = \frac{c_{\text{Carotinoid, Ende}} - c_{\text{Carotinoid, Start}}}{t_{\text{Ende}} - t_{\text{Start}}} \text{ [mg L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{]} \quad (\text{Gleichung 7})$$

$c_{\text{Carotinoid, Start}}$  = Gesamt-Carotinoid-Konzentration zum festgelegten Startpunkt [mg L<sup>-1</sup>]

$c_{\text{Carotinoid, Ende}}$  = Gesamt-Carotinoid-Konzentration zum festgelegten Endpunkt [mg L<sup>-1</sup>]

$t_{\text{Start}} - t_{\text{Ende}}$  = Zeitraum zwischen Start- und Endpunkt [h]

### 3.5.3.2. Quantitative Carotinoidbestimmung der Ölphase mittels Photometer

Über die Geradengleichung, welche sich aus der Kalibrierung vom in Sonnenblumenöl gelösten  $\beta$ -Carotin ergab, wurde die Gesamt-Konzentration an Carotinoiden in der externen Ölphase ermittelt.

$$c_{\text{Carotinoid, Ölphase}} = \frac{(E_1 - E_2) \cdot VF}{0,0435} \text{ [mg L}^{-1}\text{]} \quad (\text{Gleichung 8})$$

$E_1$  = Extinktion bei 462 nm

$E_2$  = Extinktion bei 700 nm

VF = Verdünnungsfaktor

### 3.5.4. Quantitative Carotinoidbestimmung mittels HPLC

Für die quantitative Carotinoidbestimmung aus der Biomasse, der Ölphase sowie der Kristallphase wurde ein HPLC-System der Firma SHIMADZU eingesetzt. Das System setzte sich aus dem Communications BUS MODULE CBM-20A, den Liquid Chromatograph (LC-10AT und LC-10 AT VP), einem Säulenofen (CTO-10AC), Autosampler (SIL-10A) und Dioden-Array-Detektor (SPD-M20A) zusammen. Zur Auswertung der HPLC-Messdaten wurde mit der von SHIMADZU zur Verfügung gestellte Software LabSolution (Version 5.93) vorgenommen. Die für die Carotinoidbestimmung geeignete C18-Säule NUCLEODUR® C18 isis (Fa. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) wurde im Säulenofen nach Herstellerangaben fixiert und konstant auf 30 °C temperiert.

Eluent A: Wasser

Eluent B: Aceton (ROTISOLV® HPLC von Fa. Roth)

Flussrate: 0,7 mL min<sup>-1</sup>

**Tabelle 3. Veränderung der Eluenten-Zusammensetzung während der Kalibrierung und der Probenmessungen.**

<u>Eluent A</u>	<u>Eluent B</u>	<u>Zeit [min.]</u>
20 - 12 %	80 - 88 %	in 12
12 - 5%	88 - 95 %	in 5
5%	95%	für 5
5 - 20 %	95 - 80 %	in 3

Die im Abschnitt 3.5.3.1. „Quantitative Carotinoidbestimmung der Biomasse mittels Photometer“ untersuchte carotinoidhaltige Probe, wurde in einem Vial (Schraubgewindeflasche ND8,

Fa. LABSOLUTE®) überführt und zur Messung der quantitativen Carotinoidzusammensetzung im Autosampler der HPLC gestellt.

### 3.6. Quantitative Bestimmung der Anionen und Kationen mittels Ionenchromatographie

Für die quantitative Bestimmung von Anionen und Kationen der wässrigen Phase stand das Ionenchromatographie-System DIONEX ICS-5000+ DP der Firma Thermo Fisher zur Verfügung. Das System setzte sich aus den Hardware-Komponenten Autosampler AS-AP, Detector/Chromatography Module (ICS-5000+ DC), Dual Pump (ICS-5000+ DP) und den Conductivity Detector ICS-5000+ EG zusammen. Eine Flussrate der einzelnen Eluenten von  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$  wurde bei der Anionen und Kationen-Instrumentenmethode eingestellt. Die Steuer- und Auswertungssoftware Chromeleon 7.2 SR4 wurde zur quantitativen Bestimmung der Anionen und Kationen verwendet.

**Tabelle 4. Darstellung der verwendeten Methoden zur Bestimmung der Anionen- und Kationenkonzentration.**

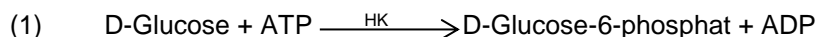
Anion				Kation			
Eluent:	bi. dest. H <sub>2</sub> O			Eluent:	bi. dest. H <sub>2</sub> O		
Eluentengenerato	KOH (Kaliumhydroxid)			Eluentengenerator	MSA (Methanesulfonic Acid)		
Säule	AS19	(Temp: 30 °C)		Säule	CS12a	(Temp: 30 °C)	
Pumpe:	$0,25 \text{ mL min}^{-1}$			Pumpe:	$0,25 \text{ mL min}^{-1}$		
Autosampler	10 °C			Autosampler	10 °C		
Methode:	<u>Zeit [min]</u>	<u>Konzentration [mM]</u>	<u>Kurve</u>	Methode:	<u>Zeit [min]</u>	<u>Konzentration [mM]</u>	<u>Kurve</u>
	0	10	5		0	5	5
	5	10	5		12	5	5
	15	40	5		12,1	20	5
	28	60	5		27,4	20	5
	28,1	10	5		27,5	5	5
	40	10	5		30	5	5

### 3.7. Bestimmung der Glucose- und Glycerinkonzentration

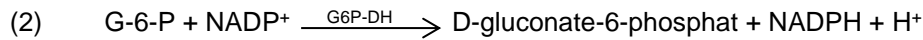
Zur Bestimmung der Konzentration an Glucose oder Glycerin wurde 1 mL Probe für 3 min. bei 13.200 rpm zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase mittels Spritzenvorsatzfilter ( $0,2 \mu\text{m}$ ) von restlichen Partikeln durch Filtration getrennt. Die filtrierte Probe wurde für die weiteren Untersuchungen entsprechend verdünnt.

#### 3.7.1. Glucosekonzentration

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration wurde mit dem UV-Test der Firma R-biopharm AG vorgenommen. Dieser beruht auf die Phosphorylierung der D-Glucose durch das Enzym Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter paralleler Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (1).



Im Weiteren wird in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) das D-Glucose-6-phosphat von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Daraus resultiert reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) (2).

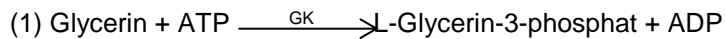


Die Menge an D-Glucose ist der während der Reaktion gebildete NADPH-Menge äquivalent. Als Messgröße dient NADPH, welches bei einer Wellenlänge von 340 nm eine Adsorption zeigt.

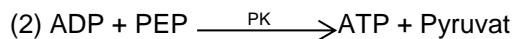
Der Glucose-Test wurde nach den Herstellervorgaben durchgeführt und die D-Glucose-Konzentration mittels der in der Herstelleranleitung angegebenen Berechnungsgleichung ermittelt.

### 3.7.2. Glycerinkonzentration

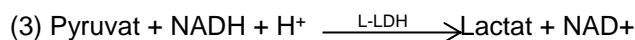
Die Konzentration an Glycerin in den Proben wurde durch die Nutzung eines UV-Tests der Firma R-biopharm AG bestimmt. Der Enzymtest besteht aus drei Reaktionsschritten und beruht auf der Phosphorylierung des Glycerins. Bei dem durch die Glycerolkinase katalysierten Reaktionsschritt reagiert Glycerin mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu L-Glycerin-3-phosphat (1).



Im zweiten Schritt wird mittels Pyruvat-Kinase (PK) unter Bildung von Pyruvat das Adenosin-5'-diphosphat (ADP) durch Phosphoenolpyruvat (PEP) in ATP überführt (2).



Durch Hydrierung des Pyruvats durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) entsteht L-Lactat. Parallel dazu wird NADH zu NAD oxidiert.



Die umgewandelte Menge an NADH ist der Glycerinmenge äquivalent und wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1. Ermittlung effizienter Limitationsbedingungen für die Carotinoidbildung (AP. 1)

Zur Ermittlung einer effizienten Nährstofflimitation kamen ausschließlich synthetische Medien, welche definierte Mikro- und Makroelemente beinhalten, zum Einsatz. So konnte eine mögliche Einflussnahme von schwer abbaubaren Komplexbildnern (EDTA, Na-EDTA, Fe-EDTA) sowie komplexen Bestandteilen (u.a. Hefeextrakt, Erdextrakt, Maisquellwasser, Sojapepton) auf das Wachstum und der Produktbildung vermieden werden. Ausnahmen waren hierbei die filamentös wachsenden *Blakeslea trispora*-Halbstämme. Die Ausgangskonzentrationen ausgewählter Anionen, Kationen und Vitaminen im Kulturmedium wurde herabgesetzt, sodass über die Versuchszeit die Einflussnahme der eingestellten Nährstofflimitation (Tabelle 5) auf den Stoffwechsel und somit auf die Wachstums- und Produktkinetik sichtbar wurde. Die Tabelle 5 gibt die Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Limitation an, welche mit der jeweiligen Position des Originalmediums substituiert wurde. Die Nährstofffracht aus der jeweiligen Vorkultur wurde nicht mit einbezogen.

**Tabelle 5. Darstellung der Ausgangskonzentrationen von Anionen, Kationen und Vitaminen zur Ermittlung einer effizienten Limitation.**

Limitation	Substanz	<i>Rh. sphaerocarpum</i>	<i>Rh. toruloides</i>	<i>X. dendrorhous</i>	<i>B.trispora</i> (+) u- (-)	<i>B.trispora</i> (+) u- (-)
		[mg L <sup>-1</sup> ]	[mg L <sup>-1</sup> ]	[mg L <sup>-1</sup> ]	[mg L <sup>-1</sup> ]	[mg L <sup>-1</sup> ]
Phosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25,00	25,00	25,00	1,25	100
Ammonium	NH <sub>4</sub> Cl	45,00	45,00	45,00	2,70	-
Magnesium	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	12,50	12,50	12,50	3,875	-
Eisen	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,0076	0,0076	0,0076	0,0076	-
Thiamin	Thiamin x HCl	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	-
Spurensalze	Spurensalze	-	-	-	-	-
Hefeextrakt	Hefeextrakt	-	-	-	-	750
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	-
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,000309	0,000309	0,000309	0,000309	-
	MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	-
	CoSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,000235	0,000235	0,000235	0,000235	-
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124	-
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0,000184	0,000184	0,000184	0,000184	-

Als Auswahlkriterium für eine geeignete Nährstofflimitation mit dem Ziel hoher Produktausbeuten wurde der vorliegende Massenanteil (%) des Zielproduktes im Organismus herangezogen. Da eine mathematische Abhängigkeit der Produktkonzentration (g L<sup>-1</sup>Produkt) u.a. von der Biotrockenmasse (g L<sup>-1</sup>BTS) (BTS) und des intrazellulären Massenanteils des Produktes besteht, wurde die Produktkonzentration für die Auswahl einer geeigneten Nährstofflimitation nicht mit einbezogen. Als alleinige Kohlenstoffquelle wurde Sonnenblumenöl der Firma Ölmühle Bobritzsch verwendet. Dadurch konnte überprüft werden, ob die ausgewählten Organismen zu einem Abbau von Triglyceriden mittels  $\beta$ -Oxidation befähigt sind und das Sonnenblumenöl effektiv als Energielieferant für Wachstum und Produktbildung nutzen können.

Die ermittelten Gesamt-Carotinoid-Anteile sowie die dazugehörigen  $\beta$ -Carotin-Anteile bei der jeweilig eingestellten Limitation sind in Abbildung 1 dargestellt.

Der *Rh. sphaerocarpum* (Grafik A) erreichte unter einer kombinierten Eisen-Stickstofflimitation den höchsten Gesamt-Carotinoid-Anteil (0,121%  $\pm$  0,002 %) und  $\beta$ -Carotin-Anteil (0,097 %  $\pm$  0,001 %) von

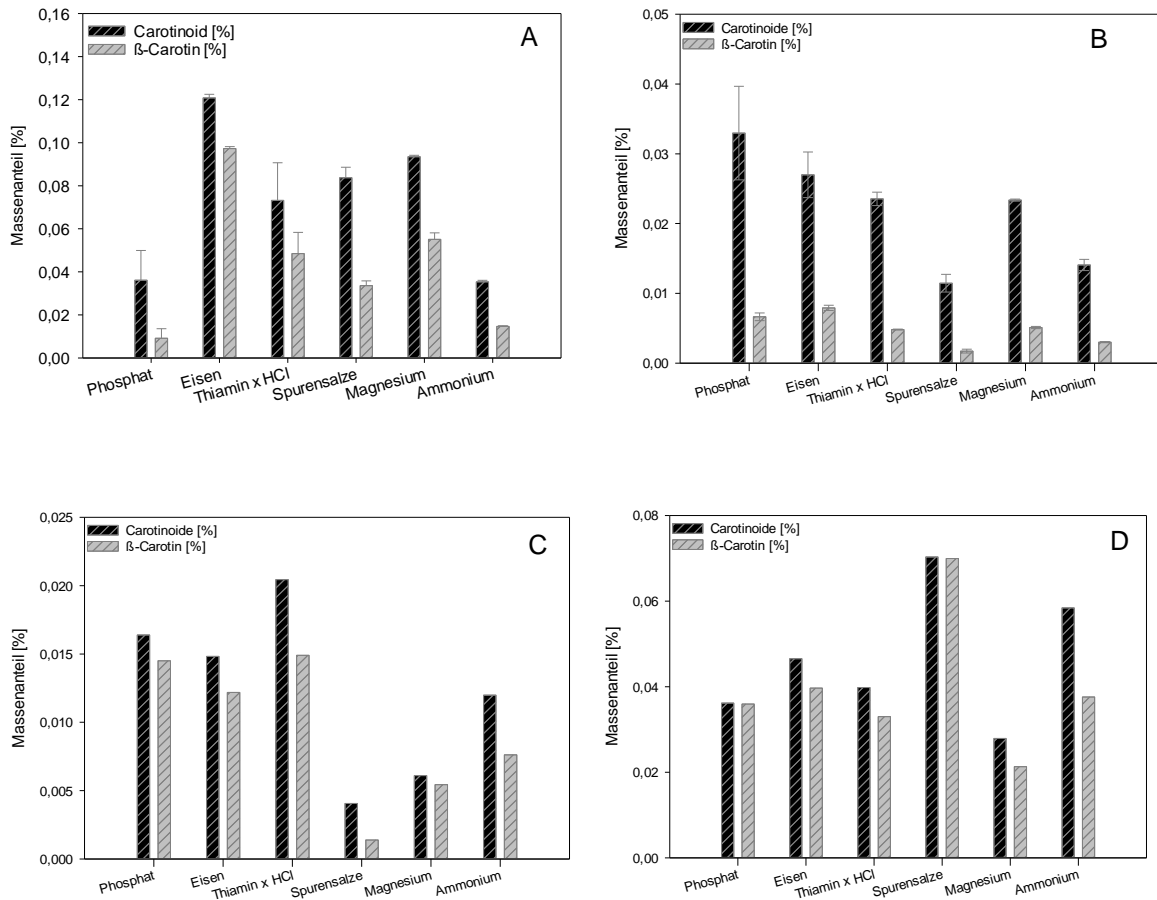
allen getesteten Mono-Kultivierungsansätzen. Mit einer BTS von  $18,82 \pm 0,98 \text{ g L}^{-1}$  konnte mit einer Eisen-Stickstofflimitation eine Gesamt-Carotinoid-Konzentration von  $22,75 \pm 1,51 \text{ mg L}^{-1}$  und  $\beta$ -Carotin-Konzentration von  $18,32 \pm 1,13 \text{ mg L}^{-1}$  erzielt werden. Mit einer reinen Stickstofflimitation wurde demgegenüber eine Gesamt-Carotinoid-Konz. von  $17,46 \pm 1,04 \text{ mg L}^{-1}$  und  $\beta$ -Carotin-Konz. von  $7,24 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$  (BTS =  $49,44 \pm 3,48 \text{ g L}^{-1}$ ) erreicht. Das Verhältnis zwischen  $\beta$ -Carotin-Konz. zur Gesamt-Carotinoid-Konz. betrug bei einer Stickstofflimitation  $41,45 \pm 0,48 \%$  und bei einer Eisen-Stickstofflimitation  $80,55 \pm 0,37 \%$ .

Die Forschungsgruppe um Yurkov et al. <sup>1</sup> ermittelte einen Gesamt-Carotinoid-Anteil von 0,076 % und ein  $\beta$ -Carotin-Anteil von 78 % (von  $0,76 \text{ mg}_{\text{Carotinoid}} \text{ g}^{-1}$ ) mit *Rh. sphaerocarpum*. Gegenüber den Literaturwerten liegen die Gesamt-Carotinoid-Massenanteile aus den Versuchen mit eingestellter Eisen-Stickstofflimitation mit den Faktor 1,59 höher. Der  $\beta$ -Carotin-Anteil von  $80,55 \pm 0,37 \%$  bewegt sich über den von der Literatur angegebenen prozentualen Bereich (78 %). Die ermittelten Werte aus den Limitationsversuchen aller Mono- und Mischkultivierungen (Doppelbestimmung) sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Resultate der Ionenchromatografie-Untersuchungen bei der Kultivierung der Hefe *Rh. sphaerocarpum* zeigten auf, dass durch eine Stickstofflimitation verschiedene wasserlösliche Stoffwechselmetabolite des Citratzyklus an das Kulturmedium abgegeben wurden. Die Citratkonzentration bewegte sich bei reproduzierbaren  $10,17 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$  und lag 13-mal höher als bei einer Phosphat- oder Eisen-Stickstofflimitation. Dies lässt die Annahme zu, dass eine reine Stickstofflimitation zur Anreicherung von Citrat im Kulturmedium und unterschiedlichen Carotinoiden in der Biomasse führt. Weiterhin wurden andere organische Säuren wie iso-Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinat und Malat, welche zur Energiegewinnung im Citratzyklus synthetisiert werden, freigesetzt. Daraus kann geschlossen werden, dass keine effektive Umwandlung des Substrates in Carotinoide erfolgt, welches durch die ermittelten Resultate belegt wurde (Tabelle 6). Im Versuchsansatz mit einer Eisen-Stickstofflimitation wurde zum Versuchsende eine Citratkonzentration von  $0,78 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$  im Kulturmedium detektiert.

Mit der Mischkultur zwischen *B. trispora* (+) und *B. trispora* (-) konnte der höchste Carotinoid- sowie  $\beta$ -Carotin-Massenanteil von  $0,24 \text{ mg}_{\text{Carotinoid}} \text{ L}^{-1}$  und  $0,19 \text{ mg}_{\beta\text{-Carotin}} \text{ L}^{-1}$  unter einer Stickstofflimitation erreicht werden. Gegenüber den erreichten Carotinoid-Massenanteil mit der Hefe *Rh. Sphaerocarpum* konnte eine Verdopplung des Carotinoid- als auch  $\beta$ -Carotin-Massenanteils erzielt werden.

**Tabelle 6. Darstellung der ermittelten Konzentrationen an Anionen und Kationen unter verschiedenen Limitationsbedingungen bei der Hefe *Rh. sphaerocarpum* zum Versuchsende.**

Limitation	Pyruvat [mg L <sup>-1</sup> ]	Citrat [mg L <sup>-1</sup> ]	iso-Citrat [mg L <sup>-1</sup> ]	Ketoglutarat [mg L <sup>-1</sup> ]	Succinat [mg L <sup>-1</sup> ]	Malat [mg L <sup>-1</sup> ]	Fumarat [mg L <sup>-1</sup> ]
Phosphat	$56,58 \pm 9,55$	$0,76 \pm 0,61$	-	-	-	$14,32 \pm 1,58$	-
Eisen	$54,65 \pm 15,86$	$0,78 \pm 0,09$	-	-	-	$12,01 \pm 0,11$	-
Thiamin	$30,54 \pm 5,88$	-	-	$0,22 \pm 0,00$	-	$13,36 \pm 1,54$	-
Trace elements	$47,76 \pm 6,14$	-	-	$0,40 \pm 0,03$	-	$8,43 \pm 0,79$	$0,19 \pm 0,00$
Magnesium	$48,20 \pm 10,12$	-	-	-	-	$12,86 \pm 0,61$	-
Ammonium	$50,45 \pm 8,14$	$10,17 \pm 0,80$	$0,015 \pm 0,00$	$0,85 \pm 0,26$	$1,57 \pm 0,1$	$9,84 \pm 0,56$	-



**Abbildung 1. Darstellung der Carotinoid- und β-Carotin-Massenanteile (%) unter definierten Kultivierungsbedingungen und Nährstofflimitationen bei *Rh. sphaerocarpum* (A), *Rh. toruloides* (B), *B. trispora* (+) (C) und *B. trispora* (-) (D).**

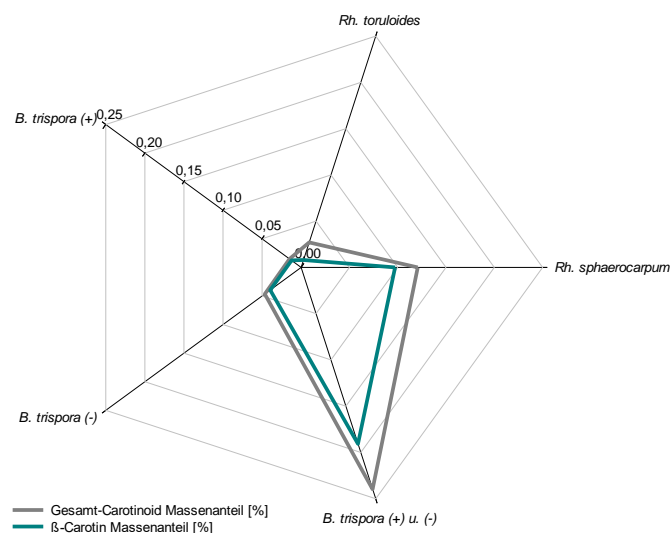
Bei den Limitationsversuchen mit der Hefe *Rh. toruloides* konnte gezeigt werden, dass durch eine Phosphatlimitation der höchste Massenanteil an Carotinoiden von 0,0164 % gebildet wurde. Als Vorzugslimitation für *Rh. toruloides* wurde ebenfalls die Eisen-Stickstofflimitation detektiert. Neben den zweithöchsten Carotinoid-Massenanteil von 0,027 % wurde der höchste β-Carotin-Massenanteil von 0,0079 % bei der Hefe *Rh. toruloides* erfasst.

Bei der Monokultivierung der filamentösen Pilze *B. trispora* (+) und (-) wurde als Vorzugslimitation für den (+)-Stamm eine Phosphatlimitation und für den (-) Stamm eine Stickstoff- und Spurensalzlimitation, welches vermehrt zur Akkumulierung von Carotinoiden führte, detektiert. Ein β-Carotin-Anteil vom Gesamt-Carotin-Anteil von 99,38 % und 99,50 % wurden bei einer Phosphat- und Spurenelementelimitation bei (-)-Stamm detektiert. Beide Halbstämme zeigten geringes bis kein Wachstum im Kulturmedium, welches als alleinige Stickstoffquelle Nitrat oder Ammonium beinhaltete. Die Hefe *X. dendrorhous* zeigte auf den synthetischen als auch auf dem empfohlenen Kultivierungsmedium der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kein Wachstum, sodass keine weiterführenden Untersuchungen mit der Hefe vorgenommen werden konnten.

**Tabelle 7. Darstellung der ermittelten Ergebnisse aus den Limitationsversuchen mit Monokulturen und einer Mischkultur bestehend aus *B. trispora* (+) und (-)**

Organismus	Limitation	$\omega_{\text{Carotinoide}}$ [%]	$\omega_{\beta\text{-Carotin}}$ [%]	Verhältnis $C_{\text{Carotinoide}}/C_{\beta\text{-Carotin}}$ [%]	$C_{\text{Carotinoide}}$ [mg L <sup>-1</sup> ]	$C_{\beta\text{-Carotin}}$ [mg L <sup>-1</sup> ]	BTS [g L <sup>-1</sup> ]
<i>Rh. sphaerocarpum</i>	Ammonium	0,0354	0,0147	41,45	17,46	7,24	49,44
	Phosphat	0,0361	0,0091	24,08	6,68	1,68	18,77
	Thiamin	0,0732	0,0485	66,76	13,85	9,10	17,93
	Eisen	0,1208	0,0973	80,55	22,75	18,32	18,82
	Magnesium	0,0935	0,0550	58,90	19,54	11,42	20,88
	Spurensalze	0,0837	0,0336	40,06	14,46	5,79	17,32
<i>Rh. toruloides</i>	Ammonium	0,0141	0,0030	21,41	1,60	0,35	11,58
	Phosphat	0,0330	0,0066	20,66	8,25	1,64	24,52
	Thiamin	0,0235	0,0048	20,46	9,92	2,03	42,17
	Eisen	0,0270	0,0079	29,58	18,57	5,42	68,35
	Magnesium	0,0234	0,0051	21,85	7,17	1,57	30,67
	Spurensalze	0,0115	0,0017	14,94	2,61	0,39	22,87
<i>B. trispora</i> (+)	Ammonium	0,0120	0,0076	63,53	0,23	0,15	1,92
	Phosphat	0,0164	0,0145	88,48	0,29	0,25	1,76
	Thiamin	0,0204	0,0149	72,90	1,54	1,12	7,53
	Eisen	0,0148	0,0122	82,20	0,86	0,71	5,80
	Magnesium	0,0061	0,0054	89,15	0,28	0,25	4,52
	Spurensalze	0,0041	0,0014	34,20	0,35	0,12	8,68
<i>B. trispora</i> (-)	Ammonium	0,0584	0,0376	64,37	1,52	0,98	2,60
	Phosphat	0,0362	0,0359	99,38	1,02	1,02	2,83
	Thiamin	0,0398	0,0330	82,88	2,82	2,33	7,07
	Eisen	0,0465	0,0397	85,26	3,72	3,17	7,99
	Magnesium	0,0279	0,0213	76,41	1,36	1,04	4,89
	Spurensalze	0,0703	0,0700	99,50	3,52	3,50	5,00
<i>B. trispora</i> (+) u. (-)	Stickstoff*	0,2397	0,1907	79,56	19,67	15,50	8,29
	Phosphat*	0,1673	0,0488	29,18	13,54	5,90	19,54

\* Medium: lösliche Stärke (15 g L<sup>-1</sup>); Hefeextrakt (4 g L<sup>-1</sup>); MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0,9213 g L<sup>-1</sup>); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>).



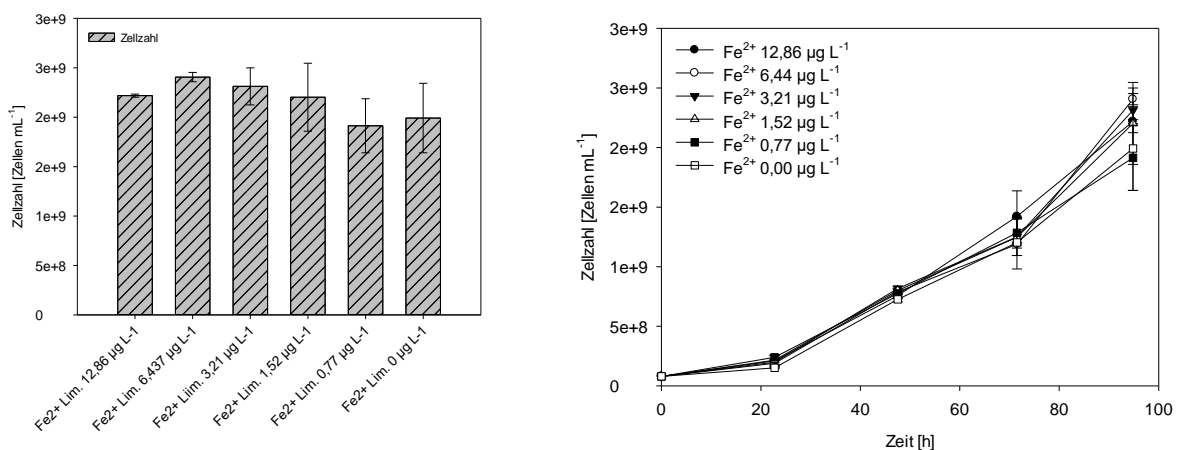
**Abbildung 2. Gegenüberstellung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration und β-Carotin-Konzentration der Monokultivierung von *B. trispora* (-), *B. trispora* (+), *B. trispora* (+) u. (-), *Rh. toruloides* und *Rh. sphaerocarpum* unter Eisen-Stickstoffmangel und der Mischkultur bestehend aus *B. trispora* (+) und (-).**

Die Resultate aus den Limitationsversuchen (Monokultivierung) zeigen auf, dass der *Rh. sphaerocarpum* und die *B. trispora* Mischkultur aufgrund ihrer hohen Gesamt-Carotinoid-Anteile,

ihres hohen  $\beta$ -Carotin-Anteils und des einfachen Handling gegenüber den anderen Kandidaten für die Produktion von Carotinoiden als **Vorzugsvariante** am geeignetsten sind (Abbildung 2).

#### Ermittlung der Grenzkonzentration an Eisen bei *Rh. sphaerocarpum*

Zur Ermittlung der Grenzkonzentration, welche einen höheren Anteil an  $\beta$ -Carotin bei der Hefe *Rh. sphaerocarpum* hervorbringt, wurden Versuche (Doppelbestimmung) mit sechs unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Eisen durchgeführt. Neben der Verhältnisbestimmung des  $\beta$ -Carotin-Anteils zum Gesamt-Carotinoid-Anteil sollte der Einfluss einer Eisen-Stickstofflimitation auf das Zellwachstum und der Produktbildung abgebildet werden. Es konnte kein signifikanter Einfluss auf die End-Zellzahl (nach 95 h) der Hefe bei unterschiedlichen Start-Eisenkonzentrationen festgestellt werden. Die Hefe-Zellzahl (Abbildung 3) bewegte sich zwischen  $1,91 \cdot 10^9$  und  $2,41 \cdot 10^9$  zum Versuchsende. Weiterhin wurde ein möglicher negativer Einfluss geringer Start-Eisenkonzentrationen auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe nicht bestätigt. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit lag zwischen  $0,028 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,036 \text{ h}^{-1}$  in Abhängigkeit des pH-Wertes, welcher zweimal täglich auf 5,5 mittels 32 % NaOH korrigiert wurde.



**Abbildung 3. Darstellung der ermittelten Zellzahlen (Links) und der Verlauf des Zellwachstums (Rechts) von *Rh. sphaerocarpum* bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Eisen während des Versuchszeitraums.**

Die Resultate der Kultivierungsansätze mit unterschiedlichen Start-Eisenkonzentrationen zeigten auf, dass mit zunehmender initialer Eisenkonzentration der Gesamt-Carotinoid-Anteil, der  $\beta$ -Carotin-Anteil und das Verhältnis zwischen  $\beta$ -Carotin und Gesamt-Carotin in der Hefezelle abnehmen. Der Massenanteil des Gesamt-Carotinoids und des  $\beta$ -Carotins stagnierte ab einer Eisen-Konzentration von  $3,21 \mu\text{g L}^{-1}$  und wurde durch den Einsatz geringerer Eisenkonzentrationen nicht signifikant beeinflusst. Aus den Ergebnissen des Versuchsansatzes konnte geschlossen werden, dass Eisen als wichtiger Regulator für die Carotinoidbildung und Carotinoid-Zusammensetzung fungiert. Die Annahme besteht, dass durch eine Eisenlimitation direkt der Ablauf des Citratzyklus beeinflusst wird. Das Eisen- und Schwefelabhängige Enzym Aconitase kann durch Minimierung der Eisenkonzentration die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat über *cis*-Aconitat nicht gewährleisten, sodass vermehrt Stoffwechselprodukte aus dem Citratzyklus zur Carotinoidsynthese über den Mevalonatweg genutzt werden. Weiterhin geht aus den Resultaten hervor, dass die Eisenfracht aus der Vorkultur, ausreichend für das Zellwachstum ist.

**Tabelle 8. Darstellung der Resultate aus den Limitationsversuchen mit unterschiedlichen Eisenstartkonzentrationen ohne Berücksichtigung der Konzentration an Eisen aus der Vorkultur.**

Fe <sup>2+</sup> -Konz. [µg L <sup>-1</sup> ]	ω <sub>Carotinoide</sub> [%]	ω <sub>β-Carotin</sub> [%]	Verhältnis C <sub>Carotinoide</sub> /C <sub>β-Carotin</sub> [%]	C <sub>Carotinoide</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	C <sub>β-Carotin</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	BTS [g L <sup>-1</sup> ]
12,86	0,0683	0,0202	28,04	29,26	9,17	42,04 ± 6,51
6,43	0,0676	0,0351	51,80	27,17	14,11	40,13 ± 0,41
3,21	0,0832	0,0494	59,38	29,32	17,45	34,34 ± 7,93
1,52	0,0806	0,0450	55,78	24,64	13,39	30,96 ± 12,84
0,77	0,0855	0,0494	57,70	27,94	16,14	32,66 ± 0,61
0,00	0,0842	0,0494	58,31	35,68	21,05	42,02 ± 3,25

Die einmalige Zugabe von Eisen ( $\leq 3,21 \mu\text{g L}^{-1}$ ) zum Versuchsbeginn zeigte keine Auswirkung auf die Wachstumskinetik der Hefe *Rh. Sphaerocarpum*, sodass fortlaufend die Untersuchungen ohne Einsatz von Eisen in den Hauptkulturen durchgeführt werden können.

Für die weitere Entwicklung des In-situ-Verfahrens wurden die *B. trispora*-Halbstämme aufgrund ihrer hohen Carotinoideausbeute im Mischsystem gegenüber dem *Rh. Sphaerocarpum* als **Vorzugsvariante** festgelegt. Weiterhin zeigten beide Halbstämme ein stabiles und zügiges Wachstum auf dem ausgewählten Kulturmedium (YpSs-Medium).

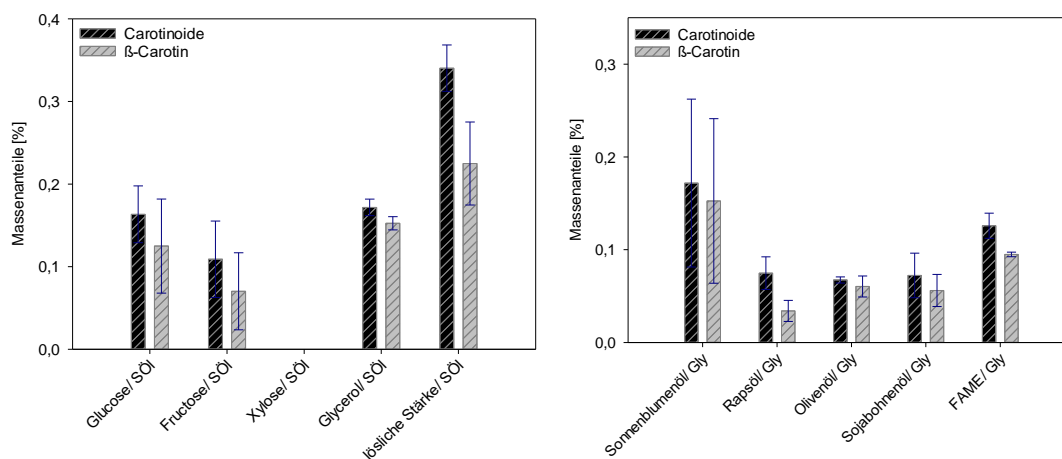
#### 4.2. Festlegung geeigneter Kohlenstoffquellen und Substitution konventioneller Extraktionsmittel durch Speiseöle (AP 2)

Im folgenden Untersuchungsabschnitt wurden verschiedene Kohlenstoffquellen zur Ermittlung des Substratspektrums eingesetzt. In einem Doppelansatz wurden im ersten Teilabschnitt die Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Xylose, Glycerol und lösliche Stärke mit einer jeweiligen Startkonzentration von  $30 \text{ g L}^{-1}$  und Sonnenblumenöl ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) als lipophile Phase verwendet, die Produktausbeuten bestimmt und miteinander verglichen. Im zweiten Untersuchungsabschnitt wurden weitere native Öle und Ölderivate (Sonnenblumenöl, Rapsöl, Sojabohnenöl, Olivenöl und Biodiesel) auf ihre Extraktionsfähigkeit während der Kultivierungsphase ohne Anwendung des In-situ-Prinzips eingesetzt. Hierbei wurde das Glycerol als wasserlösliche C-Quelle mit einer Anfangskonzentration von  $30 \text{ g L}^{-1}$  und die nativen Öle mit  $60 \text{ g L}^{-1}$  vorgelegt. In einer dritten Versuchsreihe wurde das Wachstum und die Produktbildung mit den Kohlenstoffquellen ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) Sonnenblumenöl, Rapsöl, Olivenöl, Sojabohnenöl und Biodiesel (Fettsäuremethylester-Gemisch (FAME)) ohne Zusatz von wasserlöslichen C-Quellen im Schüttelkolbenmaßstab untersucht.

Es zeigte sich, dass die wasserlösliche Kohlenstoffverbindung Xylose als Substrat für das Pilz-Wachstum und der Produktbildung ungeeignet war (Abbildung 4, Links). Es konnte kein Wachstum der Pilzhalbstäme auf dem Substrat Xylose detektiert werden. Hingegen zeigte der Pilz ein stabiles Mycel-Wachstum und eine Carotinoid-Bildung auf Glucose, Fructose, lösliche Stärke und Glycerol. Mit der löslichen Stärke als primäre C-Quelle wurde der höchste Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Massenanteil von 0,34 % und 0,22 % erreicht (Tabelle 9). Das Verhältnis zwischen den Gesamt-Carotinoiden und dem  $\beta$ -Carotin lag bei 66,09 %. Vergleichend dazu wurde eine Carotinoid/ $\beta$ -Carotin-Verhältnis von 88,79 % mit

Glycerol als Substrat erreicht. Für den weiteren Projektverlauf kann somit auf verschiedene wasserlösliche Substrate, vorzugsweise Glycerol und lösliche Stärke zurückgegriffen werden.

Im zweiten Untersuchungsabschnitt wurde festgestellt, dass alle eingesetzten nativen Öle und Biodiesel (FAME) als Extraktionsphase verwendet werden können (Tabelle 9). Es wurde kein signifikanter Einfluss der Öle und FAME auf das Wachstum der Pilz-Halbstämme festgestellt. Zudem konnte in alle Schüttelkolbenansätzen eine gleichmäßige Biomasse-Verteilung durch den Einfluss der lipophilen Phase visuell beobachtet werden. Die feinen Öltropfen üben Scherkräfte auf das Pilzmycel aus, sodass eine übermäßige Agglomeration, welche zur Verklumpung der Biomasse führt, nicht stattfand.



**Abbildung 4. Darstellung der erreichten Carotinoid- und β-Carotin-Massenanteile bei der *Blakeslea trispora*-Kultivierung [%] mit wasserlöslichen Substraten/Sonnenblumenöl (SÖl) (Links) und Glycerol (Gly) mit nativen Ölen (Rechts).**

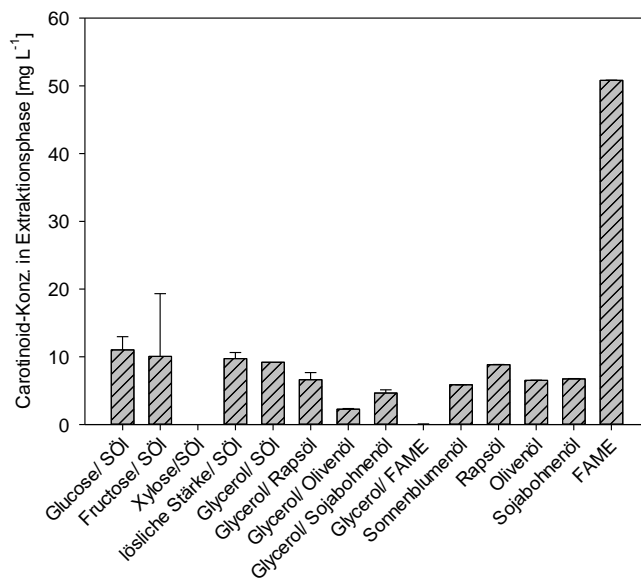
Die Abbildung 5 stellt die photometrisch ermittelten Carotinoid-Konzentrationen in den Ölphasen ohne Anwendung des In-situ-Schrittes der einzelnen Versuchsansätze dar. Es zeigte sich, dass Sonnenblumenöl prinzipiell als gutes Extraktionsmittel für Carotinoide eingesetzt werden kann. Demgegenüber können Rapsöl, Sojabohnen-Öl und Olivenöl gleichermaßen als lipophile Phase zur Carotinoid-Gewinnung fungieren. Überraschenderweise wurde bei der Kultivierung mit Biodiesel (FAME) und dem stickstoffhaltigen Hefeextrakt die höchste Konzentration an Carotinoiden in der Ölphase detektiert. Demgegenüber wurde ein höherer Carotinoid-Massenanteil in der Biomasse bei den Versuchsansätzen mit Glucose (0,24 %) und löslicher Stärke (0,3037 %) gefunden. Dies deutet darauf hin, dass bei der Kultivierung mit FAME eine spezielle Nährstofflimitation eingetreten sein kann, welche die vermehrte Abgabe von Carotinoiden an die lipophile Phase zur Folge hatte. Eine andere Ursache für den hohen Carotinoid-Anteil im Biodiesel (FAME) kann in dessen Stoffeigenschaften liegen. Der eingesetzte FAME weist gegenüber den anderen verwendeten Extraktionsmitteln eine bis zu zehnmal geringere dynamische Viskosität auf. Dazu wurden im folgenden Abschnitt vertiefte Untersuchungen vorgenommen und wissenschaftlich ausgewertet.

Bei den photometrischen Untersuchungen der Biomasse wurde zudem beim FAME ein spezifischer Peak bei 470 nm detektiert. Lycopin, als Vorstufe des β-Carotins kann durch Nährstofflimitation in das Pilzmycel agglomeriert worden sein und zeigt einen charakteristischen Peak in Aceton bei 470 nm.

Im weiteren Projektverlauf wird auf Sonnenblumenöl und FAME zur extrazellulären Gewinnung von Carotinoiden zurückgegriffen.

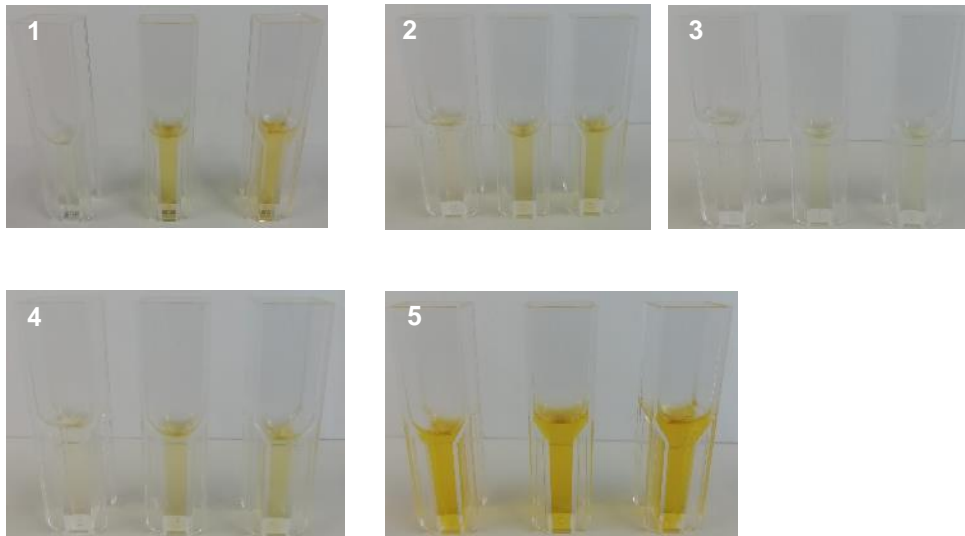
**Tabelle 9** tabellarische Auflistung der erreichten Carotinoid und  $\beta$ -Carotin-Massenanteile aus der Pilzbiomasse mit wasserlöslichen Substraten/SÖI und Glycerol mit nativen Ölen.

Art	Bezeichnung	$\omega_{\text{Carotinoide}}$ [%]	$\omega_{\beta\text{-Carotin}}$ [%]	Verhältnis $C_{\text{Carotinoid}}/C_{\beta\text{-Carotin}}$ [%]
Monosubstrat-Kultivierung	Glucose	0,2400	0,1900	79,17
	Glycerol	0,0360	0,0301	80,24
	lösliche Stärke	0,3037	0,1354	40,55
	Sonnenblumenöl (SÖI)	0,1259	0,0888	70,5513
	Rapsöl	0,1590	0,1590	100,00
	Ölivenöl	0,0980	0,0707	72,1455
	Sojabohnenöl	0,0393	0,0368	93,6907
	FAME	0,1955	0,1267	64,8048
Mischsubstrat-Kultivierung	Glucose/ SÖI	0,1635	0,1250	76,44
	Fructose/ SÖI	0,1090	0,0702	64,35
	Xylose/ SÖI	0,00	0,00	0,00
	lösliche Stärke/SÖI	0,3403	0,2249	66,09
	Glycerol/ SÖI	0,1718	0,1526	88,79
	Glycerol/ Rapsöl	0,0747	0,0340	45,55
	Glycerol/ Olivenöl	0,0674	0,0604	89,58
	Glycerol/ Sojabohnenöl	0,0723	0,0560	77,53
Glycerol/ FAME	0,1259	0,0949	75,40	



**Abbildung 5.** Grafische Darstellung der photometrisch ermittelten Carotinoid-Konzentrationen in der Ölphase zum Versuchsende (117 h) ohne Anwendung des In-situ-Verfahren.





**Abbildung 6. Gegenüberstellung der gewonnenen carotinoidhaltigen Ölphasen zum Versuchsende zu den ursprünglich eingesetzten Ölen zum Versuchsbeginn. 1: Links: Sonnenblumenöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Sonnenblumenöl zum Versuchsende; 2: Links: Rapsöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Rapsöl zum Versuchsende; 3: Links: Olivenöl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Olivenöl zum Versuchsende; 4: Links: Sojabohnen-Öl zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: Sojabohnen-Öl zum Versuchsende; 5: Links: Biodiesel (FAME) zum Versuchsstart; Mitte und Rechts: FAME zum Versuchsende;**

Die Organismen (*B. trispora* als Mischkultur aus (+) und (-) Halbstamm) mit der höchsten Carotinoid-Ausbeute in der Biomasse wurden sondiert und eine geeignete Kohlenstoffquelle (lösliche Stärke) sowie Extraktionsmittel (Sonnenblumenöl und Biodiesel (FAME)) mit der höchsten Produktausbeute gefunden. Somit konnte der **Meilenstein 1** im vorgegebenen Projektzeitraum vollständig bearbeitet und erfolgreich abgeschlossen werden.

#### *Nachweis der extrazellulären Sekundärstoffübertragung im Extraktionsmittel zwischen den Blakeslea-Pilzhalfstämmen*

Während der laufenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass der (-)-Pilzhalfstamm die höchste Produktreinheit ( $\beta$ -Carotin) bei einer Stickstofflimitation erreichte. Im Gegensatz dazu wurde beim (+)-Pilzhalfstamm die Phosphatlimitation als geeignete Induktionsmaßnahme zur Zwischenproduktsynthese detektiert.

#### **4.3. Bestimmung der Konzentrationsunterschiede von Kationen/Anionen in der Extraktionsphase und der wässrigen Phase (AP 3)**

Im Abschnitt 4.3 wurde zur Optimierung der Volumenverhältnisse zwischen der Extraktionsphase und der wässrigen Phase die Löslichkeit der eingesetzten Salze in der Extraktionsphase (Sonnenblumenöl, Rapsöl, Olivenöl, Sojabohnenöl, Biodiesel (Fettsäuremethylester (FAME))) ermittelt. Dafür wurde zellfreies Kulturmedium (YpSs-Medium) jeweils bei einem pH-Wert von 3,5 und 5,5, einer Temperatur von 22 °C und 28°C und einer Drehzahl von 120 rpm und 200 rpm für 5 Tage im Schüttelschrank inkubiert (Tabelle 10). Konzentrationsunterschiede an Anionen und Cationen zum Ausgangsmedium wurde mittels Ionenchromatographie detektiert. Augenmerk wurde insbesondere auf Carbonsäuren wie Citrat, Isocitrat,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Succinat und Pyruvat sowie auf Stickstoffverbindungen (Ammonium, Nitrat) und Phosphate gelegt, welche direkten Einfluss auf das Wachstum und der Produktbildung ausüben könnten.

**Tabelle 10. Darstellung des ausgeführten Versuchsschemas.**

Parameter	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	Variante 5	Variante 6	Variante 7	Variante 8
Temperatur [°C]	22	28	28	22	22	28	28	22
Drehzahl [rpm]	120	120	200	200	120	120	200	200
pH-Wert	3,5	3,5	3,5	3,5	5,5	5,5	5,5	5,5

Es zeigte sich, dass keine signifikanten Konzentrationsänderungen von Anionen und Kationen über die Versuchszeit zwischen der wässrigen Phase und der lipophilen Phase bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen stattfand. Dies zeigt auf, dass die eingesetzten nativen Öle und FAME keinen Einfluss auf die Medienzusammensetzung ausüben und somit eine Modifikation des Kulturmediums zur Verhinderung eines vorzeitigen oder verspäteten Limitationseintritts nicht notwendig ist.

**Tabelle 11. Darstellung der relativen Standardabweichung von Anionen und Kationen bei identischen Medium und unterschiedlichen Temperaturen, Drehzahlen und pH-Werten gegenüber dem Ausgangsmedium.**

Eingesetztes Öl	Citrat	iso-Citrat	Pyruvat	Succinat	Nitrat	$\alpha$ -Ketoglutar säure	Phosphat	Ammonium
	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]	Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ] Standardabweichung [%]
Rapsöl	64,151 (0,0799)	0,87 (0,18)	6,98 (0,64)	11,70 (0,24)	4,69 (0,16)	1,18 (0,98)	77,17 (0,02)	95,25 (0,00)
Sonnenblumenöl	63,68 (0,0115)	0,86 (0,06)	6,96 (0,36)	11,71 (0,24)	4,70 (0,14)	1,20 (0,00)	77,14 (0,00)	95,25 (0,00)
Olivenöl	63,63 (0,083)	0,86 (0,16)	6,95 (0,12)	11,72 (0,19)	4,71 (0,22)	1,19 (0,16)	77,14 (0,00)	95,26 (0,00)
Sojabohnenöl	63,64 (0,003)	0,85 (0,00)	6,97 (0,59)	11,67 (0,01)	4,70 (0,11)	1,2 (0,13)	77,14 (0,00)	95,25 (0,00)
FAME	63,63 (0,0)	0,86 (0,00)	6,96 (0,21)	11,66 (0,07)	4,69 (0,12)	1,23 (0,22)	77,14 (0,00)	95,25 (0,00)

#### 4.4. Bestimmung optimaler Medienbedingungen für die Produktbildung und- freisetzung (AP 4)

##### 4.4.1. Optimierung des Gehaltes der anorganischen Medienkomponenten

Zur Optimierung des Gehaltes an anorganischen Medienkomponenten wurden die Anfangskonzentrationen von Hefeextrakt als Stickstoffquelle und Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) als Phosphatquelle variiert. Zur Erhaltung der Vergleichbarkeit wurde darauf geachtet, dass zum Versuchsende in allen Kultivierungsansätzen die zugegebene Konzentration an Hefeextrakt und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  identisch waren. Eine Besonderheit der verwendeten Organismen (*B. trispora* Halbstämme) ist die gegenseitige Stimulation durch Austausch von Trisporate und dessen Vorstufen, welche durch die Zusammenführung beider Halbstämme (Mating) in einem Kultursystem, hervorgerufen wird.

Beide *B. trispora* Halbstämme wurden getrennt voneinander für 48 h bei 28 °C und 120 rpm im YpSs-Kulturmedium mit Sonnenblumenöl als lipophile Phase (60 g L<sup>-1</sup>) kultiviert. Beim Mating beider Halbstämme wurde ein Volumenverhältnis von 1:5 (B.t. (+) zu B.t. (-)) eingestellt. Zur Erhöhung des oxidativen Stresses wurde die Kultivierungstemperatur auf 22 °C gesenkt. Durch den Temperaturshift wird die Löslichkeit von Sauerstoff im Kulturmedium erhöht. Der Versuchsansatz wurde für 116 h bei 22°C und 120 rpm gefahren.

Im ersten Teilabschnitt wurden drei Varianten getestet:

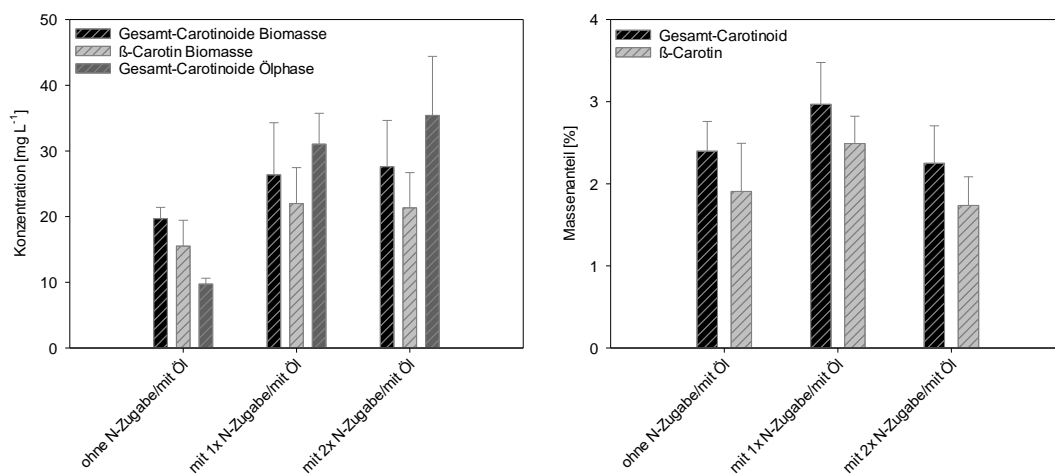
1. Ohne Limitationsaufhebung: Hefeextrakt mit einer Ausgangskonzentration von 15 g L<sup>-1</sup>
2. Mit Limitationsaufhebung: Hefeextrakt mit einer Ausgangskonzentration von 11,5 g L<sup>-1</sup>, Limitationsaufhebung nach 44 h durch die Zugabe von 2,5 mL Hefeextrakt (75 g L<sup>-1</sup>)
3. Mit Limitationsaufhebung: Hefeextrakt mit einer Ausgangskonzentration von 11,5 g L<sup>-1</sup>, Limitationsaufhebung nach 44 h und 92 h durch die Zugabe von 1,25 mL Hefeextrakt (75 g L<sup>-1</sup>)

Vorab wurden Doppel-Versuchsansätze mit einer Hefeextrakt-Konzentration von 5 g L<sup>-1</sup> und 2,5 g L<sup>-1</sup> im Kulturmedium vorgenommen. Die geringe Nährstoff- Vitamin- und Aminosäurefracht, welche durch die verminderte Hefeextrakt-Konzentration vorlag, verursachte ein geringes Wachstum mit vollständiger Biomasse-Agglomeration. Dies führte zu einem morphologisch ungünstigen Zustand, welche zu einem verminderten Stoffaustausch (Gasaustausch, Nährstoffaustausch) führte.

Die Resultate der Versuchsansätze ohne und mit In-situ-Verfahren sind in Abbildung 7 und Tabelle 12 und 13 dargestellt. Die ermittelten Versuchsdaten legen nahe, dass eine Aufhebung der vorher eingetretenen Stickstofflimitation zur vermehrten Ausschleusung von Carotinoiden in die lipophile Phase führte. Überraschenderweise wurde zugleich eine Zunahme des Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Massenanteils in der Biomasse festgestellt. Bei den Kultivierungsansätzen ohne die Anwendung des In-situ-Verfahrens (ohne Limitationsaufhebung) wurden 19,67 mg L<sup>-1</sup> Carotinoide und davon 15,50 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin intrazellulär akkumuliert. Zugleich wurden 9,72 mg L<sup>-1</sup> Carotinoide an die Ölphase abgegeben. Demgegenüber wurde mit einer einmaligen Limitationsaufhebung nach 44 h (nach dem Mating) eine Carotinoid-Konz. von 26,36 mg L<sup>-1</sup> (21,99 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin) und bei einer zweimaligen Limitationsaufhebung (nach 44 h und 92 h) eine Carotinoid-Konz. von 27,62 mg L<sup>-1</sup> (21,33 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin) erreicht. Die Carotinoid-Konz. in der Ölphase (Sonnenblumenöl) lag zum Versuchsende bei 31,04 mg L<sup>-1</sup> (1 x Limitationsaufhebung) und 35,41 mg L<sup>-1</sup> (2 x Limitationsaufhebung). Mit dem In-situ-Verfahren lag die intrazelluläre Carotinoid-Konz. mit dem Faktor 1,4 und die extrazelluläre Carotinoid-

Konz. (Ölphase) mit dem Faktor 3,6 höher. Die Produktivität belief sich auf 0,13 (ohne Limitationsaufhebung), 0,19 (1 x Limitationsaufhebung) und 0,18 (2 x Limitationsaufhebung).

Mit der Darstellung der Massenanteile kann exemplarisch gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Limitationsaufhebung und der erneute darauffolgende Limitationseintritt mit anschließender Produktsynthese Konzentrations- und zeitabhängig ist. Bei der einmaligen Aufhebung der Limitation nach 44 h stand dem Pilz ein Zeitraum von 72 h zur weiteren Produktsynthese und Produktausschleusung zur Verfügung. Dem hingegen hatte der Pilz bei zweimaliger In-Situ-Anwendung noch einen Zeitraum von 24 h (nach der zweiten Limitationsaufhebung) für die weitere Carotinoid-Akkumulierung zur Verfügung. Dies zeigt auf, dass nach dem In-situ-Schritt eine Abgabe der intrazellulären Carotinoide an die lipophile Phase vonstattengeht und die Neusynthese des Zielproduktes eine Funktion der Zeit darstellt.



**Abbildung 7.** Darstellung der erreichten Carotinoid-Konzentration und  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Biomasse, die Konzentration an Carotinoiden in der Ölphase (Links) sowie Gesamt-Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Masseanteile (Rechts) zum Versuchsende ohne N-Zugabe, mit einmaliger und zweimaliger N-Zugabe (In-situ).

**Tabelle 12.** Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen und Carotinoid-Massenanteile sowie die Biomasse-Konzentration und Produktivität bei unterschiedlichen Variationen der Hefeextrakt-Konzentration ohne und mit In-situ-Verfahren.

Art	BTM [g L <sup>-1</sup> ]	Gesamt-Carotinoid [mg L <sup>-1</sup> ]	$\beta$ -Carotin [mg L <sup>-1</sup> ]	Carotinoide Ölphase [mg L <sup>-1</sup> ]	Massenanteil Carotinoide [%]	Massenanteil $\beta$ -Carotin [%]	Produktivität Carotinoide [mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Produktivität $\beta$ -Carotin [mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
ohne N-Zugabe/mit Öl	8,28 ± 0,53	19,67 ± 1,73	15,50 ± 3,94	9,72 ± 0,90	2,40 ± 0,36	1,91 ± 0,57	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,03
mit 1 x N-Zugabe/mit Öl	8,69 ± 1,17	26,36 ± 7,93	21,99 ± 5,47	31,04 ± 4,70	2,97 ± 0,51	2,49 ± 0,33	0,23 ± 0,07	0,19 ± 0,05
mit 2 x N-Zugabe/mit Öl	12,17 ± 0,69	27,62 ± 7,04	21,33 ± 5,37	35,41 ± 8,99	2,25 ± 0,46	1,74 ± 0,35	0,24 ± 0,06	0,18 ± 0,05

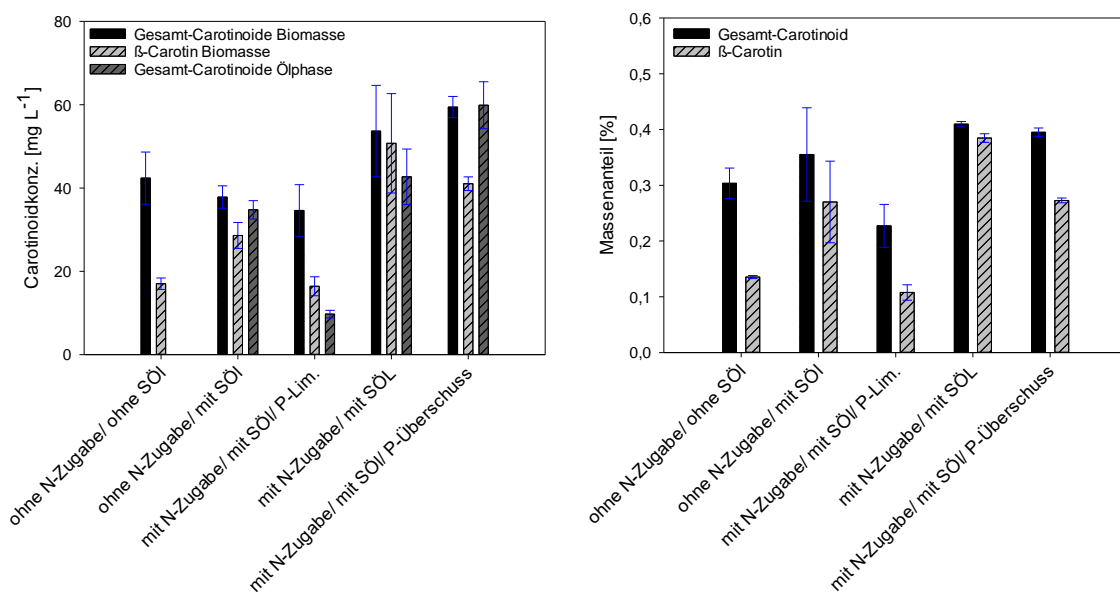
Die Produktausbeuten bezogen auf die Biomassen sind in Tabelle 13 wiedergegeben. Mit der einmaligen Stickstoffzugabe konnte mit 3,19 mg<sub>Carotinoid</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> die höchste Gesamt-Carotinoid-Ausbeute erreicht werden. Vergleichend dazu wurde für die Versuchsansätze ohne Limitationsaufhebung eine Gesamt-Carotinoid-Ausbeute von 2,47 mg<sub>Carotinoid</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> ermittelt. Mit der Anwendung des In-situ-Verfahrens konnte die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute mit dem Faktor 1,3 erhöht werden. Die Versuchsansätze mit zweimaliger N-Zugabe zeigten eine geringere Gesamt-Carotinoid-Ausbeute. Dies kann auf die höhere Biomassekonzentration (Mittelwert: 12,17 g L<sup>-1</sup>), welche in diesen

Versuchsansätzen erreicht wurden, begründet werden. Weiterhin lag die Limitationsaufhebung 24 h zurück, sodass der Pilz ein Teil der Carotinoide an die lipophile Phase abgegeben hatte, jedoch keine ausreichende Zeit für die intrazelluläre Carotinoid-Akkumulierung zur Verfügung stand.

**Tabelle 13. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Ausbeuten bezogen auf die Biomasse-Konzentration bei unterschiedlichen Variationen der Hefeextrakt-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.**

Art	Carotinoid/BTM [mg <sub>Carotinoide</sub> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]	Carotinoid in Ölphase/BTM [mg <sub>Carotinoide</sub> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]	Gesamt-Carotinoid [mg <sub>Carotinoide</sub> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]
ohne N-Zugabe/mit Öl	2,40	0,07	2,47
mit 1x N-Zugabe/mit Öl	2,97	0,22	3,19
mit 2 x N-Zugabe/mit Öl	2,25	0,18	2,43

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde die Konzentration an Phosphat variiert, sodass gegenüber dem Standardmedium (mit und ohne N-Zugabe) Kulturmedium mit verringerter und eines mit erhöhter Phosphatfracht eingesetzt wurden. Im Standardmedium wurden 1 g L<sup>-1</sup>, im phosphatlimitierten Medium 0,5 g L<sup>-1</sup> und im Kulturmedium mit Phosphatüberschuss 2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> vorgelegt. Die Kultivierungsansätze wurden bei 28 °C, 120 rpm, mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL (YpSs-Medium) für 119 h im Schüttelinkubator vorgenommen. Aus den erhaltenen Resultaten wird ersichtlich, dass die Gesamt-Carotinoid- und β-Carotin-Konzentration in der Biomasse sowie die Carotinoid-Konzentration in der Ölphase signifikant vom Phosphat-Gehalt im Kulturmedium beeinflusst werden (Abbildung 8). Bei einer phosphatlimitierten Kultivierungsweise wurde die geringste Konzentration an Carotinoiden zum Versuchsende (34,60 mg<sub>Carotinoid</sub> L<sup>-1</sup> und 16,40 mg<sub>β-Carotin</sub> L<sup>-1</sup>) in der Biomasse und in der Ölphase detektiert (9,72 mg<sub>Carotinoid</sub> L<sup>-1</sup>).



**Abbildung 8. Darstellung der Carotinoid-, β-Carotin-Konzentration (Biomasse) und der Carotinoid-Konzentration in der Ölphase (extrazellulär) (Links) sowie die erreichten Carotin-Massenanteile in der Biomasse (Rechts) zum Kultivierungsende bei unterschiedlichen Phosphat-Ausgangs-Konzentrationen.**

Dementgegen zeigten die Kultivierungsansätze mit  $1 \text{ g L}^{-1}$  und  $2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  höhere Carotinoid-Konzentrationen (Faktor 1,55 und 1,72) zum Kultivierungsende (Tabelle 14). Mit  $60 \text{ mg L}^{-1}$  Carotinoid in der Ölphase lag der Kultivierungsansatz mit einem Phosphatüberschuss am höchsten. Vergleichend dazu wurde eine  $\beta$ -Carotin-Wiederfindungsrate von 94,5% bei den Versuchsansätzen mit standardmäßiger  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) detektiert. Für eine spätere Produktapplikation ist es essentiell, dass ein hoher Reinheitsgrad an  $\beta$ -Carotin in der Biomasse vorliegt, damit der Downstream-Prozess entlastet und Kosten eingespart werden können. Resultierend daraus wurde im weiteren Projektverlauf das Augenmerk auf  $\beta$ -Carotin, als Ziel-Carotinoid gelegt. Ein weiterer Beweggrund ist der bereits vorhandene  $\beta$ -Carotin-Markt, welcher zukünftig durch das neue In-situ-Verfahren belebt werden kann.

**Tabelle 14. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen und Carotinoid-Massenanteile sowie die Biomasse-Konzentration und Produktivität bei unterschiedlichen Variationen der Phosphat-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.**

Art	BTM [ $\text{g L}^{-1}$ ]	Gesamt-Carotinoid [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	$\beta$ -Carotin [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	Carotinoide Ölphase [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	Massenanteil Carotinoide [%]	Massenanteil $\beta$ -Carotin [%]	Produktivität Carotinoide [ $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	Produktivität $\beta$ -Carotin [ $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]
ohne N-Zugabe/ ohne SÖI	$13,88 \pm 0,82$	$42,38 \pm 6,27$	$17,012 \pm 1,37$	0	$0,30 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,00$	$0,36 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,01$
ohne N-Zugabe/ mit SÖI	$12,53 \pm 2,54$	$37,83 \pm 2,71$	$28,59 \pm 3,12$	$34,76 \pm 2,21$	$0,36 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$
mit N-Zugabe/ mit SÖI/ P-Lim.	$15,20 \pm 0,17$	$34,60 \pm 6,21$	$16,40 \pm 2,28$	$9,72 \pm 0,90$	$0,23 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,02$
mit N-Zugabe/ mit SÖI	$13,13 \pm 2,83$	$53,68 \pm 10,98$	$50,75 \pm 11,92$	$42,71 \pm 6,67$	$0,41 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,00$	$0,45 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,10$
mit N-Zugabe/ mit SÖI/ P-Überschuss	$15,04 \pm 0,36$	$59,45 \pm 2,53$	$41,04 \pm 1,63$	$59,89 \pm 5,63$	$0,40 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,00$	$0,42 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$

**Tabelle 15. Tabellarische Darstellung der ermittelten Carotinoid-Ausbeuten bezogen auf die Biomasse-Konzentration bei unterschiedlichen Variationen der Phosphat-Konzentration ohne und mit N-Zugabe.**

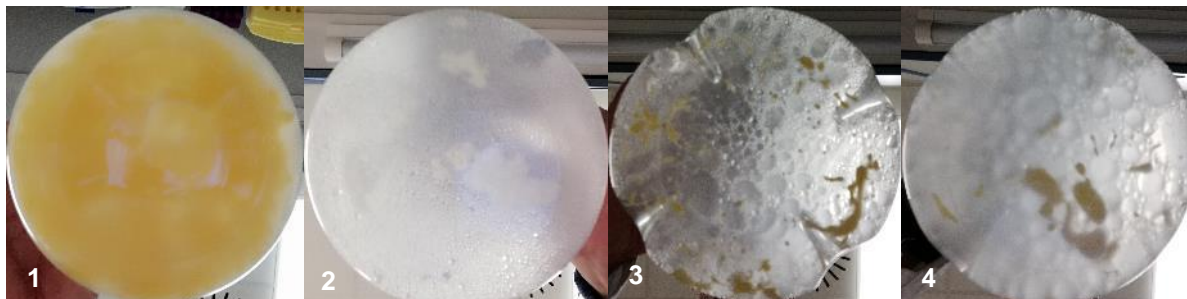
Art	Carotinoid/BTM [ $\text{mg}_{\text{Carotinoide}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]	Carotinoid in Ölphase/BTM [ $\text{mg}_{\text{Carotinoide}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]	Gesamt-Carotinoid [ $\text{mg}_{\text{Carotinoide}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]
ohne N-Zugabe/ ohne SÖI	3,05	1,23	3,05
ohne N-Zugabe/ mit SÖI	3,02	2,28	3,21
mit N-Zugabe/ mit SÖI/ P-Lim.	2,28	1,08	2,32
mit N-Zugabe/ mit SÖI	4,09	3,86	4,29
mit N-Zugabe/ mit SÖI/ P-Überschuss	3,95	2,73	4,19

Im weiteren Untersuchungsverlauf konnte kein signifikanter Einfluss von Natrium, Chlor, Sulfat, Kalium und Magnesium auf die Produktbildung beobachtet werden. Weiterhin wurde keine Konzentrationsänderung der Anionen (Chlor, Sulfat) und Kationen (Natrium, Kalium und Magnesium) über den gesamten Versuchszeitraum detektiert. Dennoch sind für die Zellwand- und Zellmembran-Aktivitäten sowie die Funktionalität diverser Stoffwechselwege (Glycolyse, Zitronensäurezyklus, Atmungskette) das Vorhandensein von den benannten Anionen und Kationen essentiell.

#### 4.4.2. Substitution komplexer Medienbestandteile (z.B. Hefeextrakt, Maisquellwasser)

Für die Substitution des eingesetzten Hefeextraktes wurden verschiedene Stickstoffverbindungen getestet. Es wurden Ammoniumsulfat, Kaliumnitrat und Harnstoff in jeweils einem Schüttelkolben-Doppelansatz bei 120 rpm und  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  eingesetzt. Alle Kultivierungsansätze im synthetischen Medium zeigten eine geringe bis keine morphologische Ausbildung des Pilzmycels nach 24 h. Nach einer Kultivierungszeit von 48 h wurde keine weitere Zunahme der Biomasse im Schüttelkolben detektiert

(Abbildung 9). Eine mögliche Ursache für das geringe Wachstum kann das Fehlen von Vitaminen, Aminosäuren oder Nährsalzen sein. Nach momentanen Forschungsstand sind das Wachstum und die Produktbildung der beiden *B. trispora* Halbstämme auf synthetischen Medium unzureichend untersucht, sodass fortlaufend Unternehmungen zur Optimierung eines synthetischen Kulturmediums erforderlich sind. In der weiteren Projektbearbeitung wurde daher fortgesetzt Hefeextrakt als Stickstoffquelle eingesetzt.



**Abbildung 9. Grafische Gegenüberstellung der Kultivierungsansätze mit Hefeextrakt (1), Harnstoff (2), Ammoniumsulfat (3) und Kaliumnitrat (4) nach 48 h Kultivierungszeit.**

#### **4.4.3. Der Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Membrandiffusionsvorgänge**

In diesem Untersuchungsabschnitt wurde der Einfluss verschiedener Anionen und Kationen auf die Membrandiffusionsvorgänge während des Extraktionsvorganges untersucht. Hierfür wurden im Dreifachansatz die Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesium-Konzentration zum Zeitpunkt des Matings zwischen (+)- und (-)-Halbstamm verdoppelt und die Schüttelkolben bei 22 C°, 120rpm im Schüttelinkubator für 119 h kultiviert. Bei der Auswertung wurde die Carotinoid-Konzentration in der Ölphase photometrisch erfasst und miteinander verglichen.

Aus den Resultaten (Abbildung 10) wird ersichtlich, dass die Konzentrationsänderung von verschiedenen Kationen den Membrandiffusionsvorgang geringfügig beeinflussen kann. Werden die unteren Standardabweichungsgrenzen berücksichtigt, bewegen sich alle ermittelten Carotinoid-Konzentrationen im Bereich von 26 mg L<sup>-1</sup>. Alle getesteten Kationen sind befähigt, den Membrandiffusionsvorgang zu stimulieren. So wurde mit der Verdopplung von Natrium im Kultursystem eine Erhöhung der Carotinoid-Konzentration von 23,22 mg L<sup>-1</sup> auf 38,88 mg L<sup>-1</sup> in der Ölphase erreicht. Die Versuchsansätze mit Kalium (31,04 mg L<sup>-1</sup>), Calcium (35,41 mg L<sup>-1</sup>) und Magnesium (29,34 mg L<sup>-1</sup>) zeigten ebenfalls gegenüber den Versuchsansatz ohne Erhöhung der Kationen-Konzentration nach dem Mating eine verbesserte Produktausbeute in der anfallenden Ölphase. Resultierend daraus kann zur Erhöhung der Produktausbeuten in der Ölphase zukünftig auf die Zugabe von verschiedenen Kationen zurückgegriffen werden.



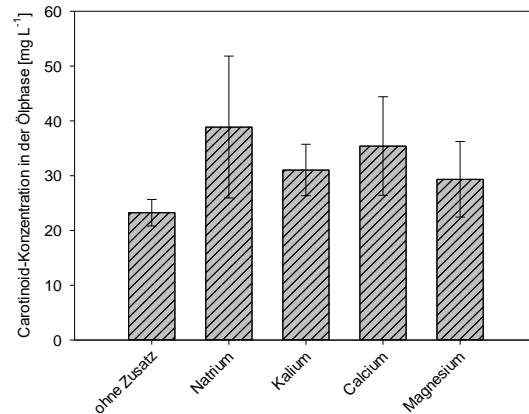


Abbildung 10. Darstellung der ermittelten Carotinoid-Konzentrationen in der Ölphase ohne und mit Zugabe von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium.

#### 4.4.4. Kultivierungen mit Rohglycerol und weitere preiswerte Nebenstoffströme der Biodieselindustrie (Glycerolphase).

Nachdem beide *B. trispora* Halbstämme ein stabiles Wachstum und eine hohe Produktbildung auf Glycerol als Kohlenstoffquelle gezeigt hatten, wurden weitere Kultivierungsansätze mit Rohglycerol und Glycerolwasser als preiswerte Abprodukte der Biodieselherstellung vorgenommen. Die Startkonzentration an Rohglycerol und Glycerolwasser wurde mit 30 g L<sup>-1</sup> festgelegt. Die Schüttelkolben wurden bei 120 rpm und 28 °C im Schüttelschrank unter Lichtausschluss kultiviert.

Der *B. trispora* (-)-Halbstamm zeigte sowohl auf Rohglycerol als auch auf Glycerolwasser ein pelletartiges Wachstum. Bei der Agglomeration des Pilzmycels wird die Kontaktfläche kleiner, sodass ab dem Zeitpunkt des Matings zwischen (+) und (-) Halbstamm der Stoffaustausch von Sekundärstoffwechselprodukte, welche zur Carotinoidsynthese führen, minimal sind. Dem folgend würden die Produktausbeuten gegenüber den Kosten-Zeitaufwand gering sein.

Der (+)-Halbstamm zeigte vergleichend zum (-)-Halbstamm eine flockenartige Mycelausbildung, welche wiederum eine große Stoffaustauschfläche bereitstellte. Aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens des (+)- und (-)-Halbstammes (Flockig und Agglomerat) auf demselben Kulturmedium sind Rohglycerol und Glycerol-Wasser als wasserlösliche Kohlenstoffquelle für die Produktion von Carotinoiden nach bisherigem Forschungsstand ungeeignet.



Abbildung 11. Darstellung des Wachstumsverhaltens der *Blakeslea trispora* Halbstämme. 1: *B. trispora* (-) auf Rohglycerol; 2: *B. trispora* (-) auf Glycerolwasser; 3: *B. trispora* (+) auf Rohglycerol; 4: *B. trispora* auf Glycerolwasser nach einer Kultivierungszeit von 48 h.

#### 4.4.5. Optimierung der Mono- und Mischsubstratkultivierung der ausgewählten Hefen oder Pilze

In den bisherigen Untersuchungen im AP 4 ging hervor, dass eine Monosubstratkultivierung bspw. mit Glucose als primäre C-Quelle eine geringfügigere Produktausbeute im Vergleich zur Mischsubstratkultivierung mit sich brachte. Zudem wird aktuell auf Hefeextrakt als Stickstoffquelle zurückgegriffen, welches neben Nährsalzen, Vitaminen und Aminosäuren auch kohlenstoffhaltige Verbindungen (Glucose) mit sich bringt und somit eine Monosubstratkultivierung mit dem ausgewählten Medium nicht möglich ist. Weiterhin wurde in den Untersuchungen gezeigt, dass sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung auf synthetischen Medium nach aktuellem Forschungsstand geringfügig möglich war.

Zur Optimierung der Mischsubstratkultivierung der ausgewählten Pilz-Halbstämme wurde der Einfluss von Thiamin x HCl, Mangan und Vitamin B12 auf das Wachstum und der Produktbildung im YpSs-Kulturmedium getestet. Eine Start-Konzentration von 0,001 g L<sup>-1</sup> (Thiamin x HCl und Vitamin B12 und MnSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (Mangan-Konz. 0,001 g L<sup>-1</sup>)) wurde definiert und die Schüttelkulturen bei 28 °C (22 °C nach Mating) und 120 rpm im Schüttelinkubator kultiviert.

In Abbildung 12 sind die massebezogenen Ausbeuten an Carotinoid und  $\beta$ -Carotin in der Biomasse und der Ölphase dargestellt. Beide *B. trispora* Halbstämme zeigten ein zügiges Wachstum mit flockenartiger Mycelausbildung im Kulturmedium mit den Zusätzen Thiamin x HCl und Vitamin B12. Die Kultivierungsansätze mit erhöhter Mangan-Start-Konzentration zeigten kein Wachstum, sodass davon ausgegangen werden musste, dass Mangan in höheren Konzentrationen als Wachstumsinhibitor wirkt. Mit dem Zusatz Thiamin x HCl wurde eine Carotinoid-Ausbeute von 6,40 mg g<sub>BTS</sub><sup>-1</sup> und eine  $\beta$ -Carotin-Ausbeute von 2,60 mg g<sub>BTS</sub><sup>-1</sup> erreicht. Dies lässt sich dadurch begründen, dass das aus der Glycolyse gebildete Pyruvat über den thiaminabhängigen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA effektiver umgewandelt und über den Mevalonatweg zur Carotinoidsynthese weitergeleitet wurde. Der Zusatz von Vitamin B12 bewirkte eine Verringerung der Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Ausbeute (2,16 mg<sub>Carotinoid</sub> g<sub>BTS</sub><sup>-1</sup> und 1,11 mg <sub>$\beta$ -Carotin</sub> g<sub>BTS</sub><sup>-1</sup>).

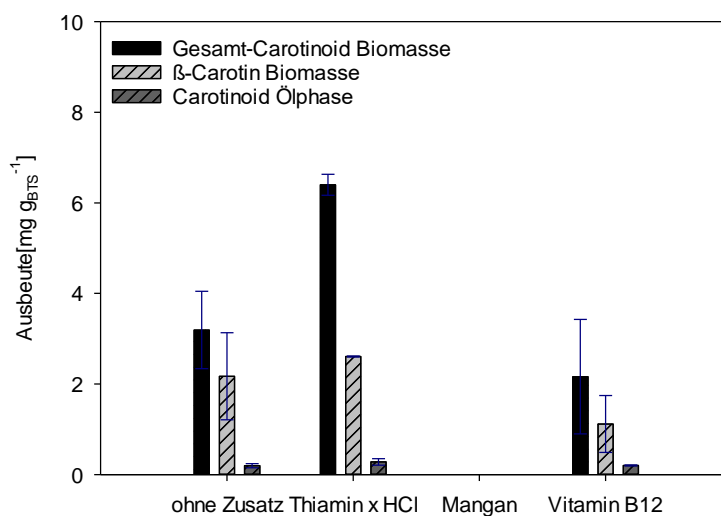


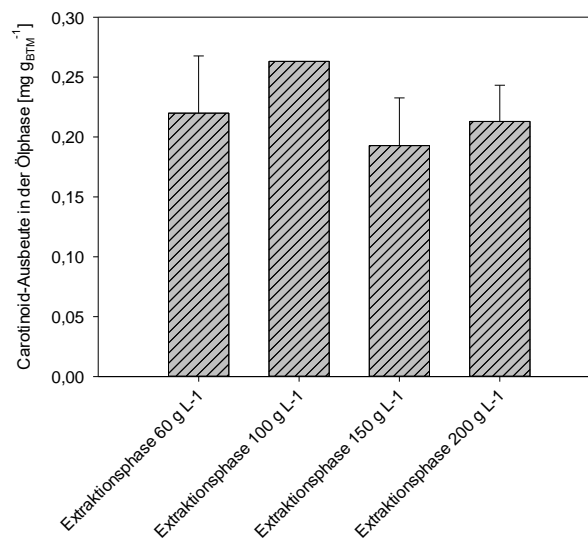
Abbildung 12. Darstellung der ermittelten Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Biomasse und in der Ölphase mit den Zusätzen Thiamin x HCl, Mangan und Vitamin B12 nach 119 h Kultivierungszeit.

Eine mögliche Verbesserung der Stoffwechselaktivität durch den Zusatz von Vitamin B12 muss jedoch mit berücksichtigt werden, welches eine zügigere Umwandlung über mehrere enzymatische Schritte des  $\beta$ -Carotins zu Trisporinsäure zur Folge hätte.

Es zeigte sich, dass Thiamin x HCl einen positiven Effekt auf die Carotinoidproduktion hat, sodass im weiteren Projektverlauf auf Thiamin ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) zur Produktion von Carotinoiden mittels *Blakeslea trispora* zurückgegriffen wird.

Zur weiteren Verbesserung der Mischsubstratkultivierung wurden Untersuchungen vorgenommen, welche eine Optimierung des Volumen-Verhältnisses zwischen der wässrigen Phase und der eingesetzten Extraktionsphase zum Ziel hatte. Dazu wurden Volumenverhältnisse (wässrige Phase : Extraktionsphase) von 1:0,05 ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ); 1:0,09 ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ); 1:0,13 ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ) und 1:0,2 ( $250 \text{ g L}^{-1}$ ) im Schüttelkolbenmaßstab eingestellt. Die Versuchsansätze wurden bei  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  nach Mating), 120 rpm für 119 h im Schüttelinkubator kultiviert.

Die vorangegangene Überlegung bestand daraus, dass mit zunehmendem Extraktionsmittelvolumen die Konzentration an gelösten Carotinoiden in der Extraktionsphase abnimmt. Es zeigte sich überraschenderweise, dass die Carotinoid-Ausbeute bezogen auf die Biomasse in den unterschiedlichen Ölvolumina zwischen  $0,19$  und  $0,26 \text{ mg}_{\text{Carotinoid}} \text{ g}_{\text{BTS}}^{-1}$  bewegte. Dies deutet auf einen aktiven oder passiven Zellmechanismus hin, welcher das Carotinoid über die Zellmembran in die Extraktionsphase bei vorliegendem Konzentrationsgradient befördert. Weiterhin kann daraus interpretiert werden, dass der Pilz eine effizientere Carotinoid-Akkumulierung mit steigendem Extraktionsmittelvolumen mit sich bringt.



**Abbildung 13. Darstellung der Resultate aus den Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Volumen-Verhältnissen zwischen der wässrigen Phase und der Extraktionsphase.**

Zur Vermeidung von Inhomogenitäten wurde im fortlaufenden Projekt in den Versuchsansätzen ein Volumenverhältnis zwischen der wässrigen Phase und der Extraktionsphase von 1:0,05 ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) eingestellt.

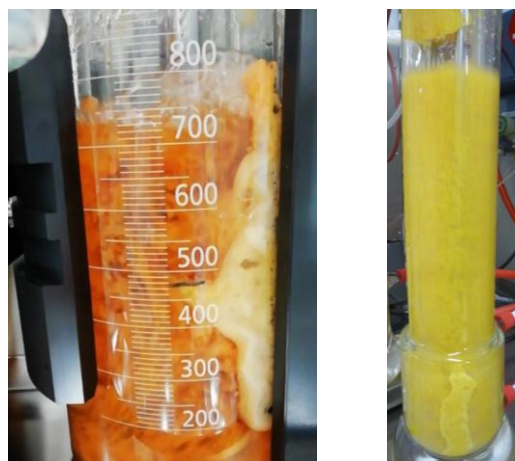
Auf Basis der vorangegangenen Resultate wurde ein geeignetes Kulturmedium (YpSs-Medium) mit dem Zusatz von Thiamin x HCl gefunden. Weiterhin wurde als Ziel-Carotinoid das  $\beta$ -Carotin aufgrund der

hohen Wiederfindungsrate in der Gesamt-Carotinoid-Zusammensetzung bestimmt. Damit konnte der **Meilenstein 2** vollständig im vorgegebenen Untersuchungszeitraum erfüllt werden.

#### 4.5. Ermittlung der apparativen und verfahrenstechnischen Bedingungen für die Maßstabsübertragung (AP 5)

Im Fokus des Arbeitspakets lag die verfahrenstechnische Charakterisierung des zukünftigen in-situ Prozesses. Dazu wurden Fermentationen bei unterschiedlichen Leistungs- und Sauerstoffeintrag im 1 L Bioreaktormaßstab durchgeführt. Das zur Verfügung stehende Multireaktorsystem (Multifors) mit sechs Reaktoreinheiten hat sich gegenüber den 2 L Bioreaktor (ein Reaktor steht zur Verfügung) aufgrund der Verfügbarkeit bewährt. Weiterhin wurde ein Vergleich zwischen den Multifors-System und einem Blasensäulensystem (vier Blasensäuleneinheiten) hinsichtlich Wachstumseigenschaften und Produktbildung vorgenommen.

Bereits im ersten Versuchsansatz im Multifors wurden Probleme hinsichtlich Pilzwachstum festgestellt. So wurde eine starke Akkumulierung der Pilzbiomasse an den Sonden (pH-Sonde und pO<sub>2</sub>-Sonde) sowie an der Reaktorglaswand und den 6-Blatt-Scheibenrührer beobachtet (Abbildung 14). Dies führte zu fehlerhaften pO<sub>2</sub> und pH-Messwerten. Trotz einer Rührerdrehzahl von 280 rpm und einer Begasungsrate von 1 vvm (75,6 W m<sup>-3</sup>) wurde die Pilzbiomasse unzureichend im Reaktorsystem verteilt. Demgegenüber wurde mit dem 1 L Blasensäulensystem eine intensivere Durchmischung bei einer Begasungsrate ab 1,5 vvm und somit bei einem geringeren spezifischen Leistungseintrag von 2,36 W m<sup>-3</sup> erreicht. Im Multifors-System wurde ein mittlerer Carotinoid-Massenanteil von 0,151 ± 0,07 % detektiert. Demgegenüber wurde ein Massenanteil an Carotinoiden im Blasensäulensystem von 0,28 ± 0,02 % festgestellt. Zielführend war demnach die Verwendung des Blasensäulensystems für die Kultivierung der Pilz-Halbstämme im weiteren Verlauf des Vorhabens.



**Abbildung 14. Bildliche Gegenüberstellung des Pilzwachstums, Links: 1 L Multifors-Glasreaktor; Rechts: 1 L Blasensäulenreaktor**

Aufgrund der vorliegenden Resultate wurde das Blasensäulensystem für eine Maßstabsübertragung vom Schüttelkolbensystem in dem Reaktorsystem als geeignet befunden. Dies bringt auf Basis der Ergebnisse im 1 L Maßstab eine bessere Nährstoff- und Biomasseverteilung mit sich. Zudem weniger Biomasseakkumulierung an den Reaktorkompartimenten und zugleich eine höhere Produktausbeute bei geringeren spezifischen Leistungseintrag.

#### 4.6. Bioprozessentwicklung/ Bioprozessführung mit In-Situ Produktgewinnung (AP. 6)

##### 4.6.1. Ermittlung der optimalen Temperatur zur In-Situ-Produktgewinnung

Bezüglich der optimalen Temperatur wurden in diversen Veröffentlichungen und eigenen Vorarbeiten festgestellt, dass die morphologische Myzelausbildung des filamentösen Pilzes *Blakeslea trispora* bei 28 °C am zügigsten vonstattengeht. In dieser Versuchsreihe wurde die Monokultivierung des (-) Halbstammes hinsichtlich der intrazellulären Produktbildung und Produktausschleusung mit der Mischkultivierung zwischen den *Blakeslea* (-) und (+) Halbstämmen unter Verwendung von Glucose (Versuch 1 und 2) und löslicher Stärke (Versuche 3 und 4) als C-Quelle miteinander verglichen. In einer Doppelbestimmung im Blasensäulensystem wurden folgende Kultivierungsparameter eingestellt:

- Startkonzentration der C-Quelle: 25 g L<sup>-1</sup> Glucose (V1, V2); 25 g L<sup>-1</sup> lösliche Stärke (V3, V4)
- 2 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (-) zum Versuchsstart (1,19\*10<sup>6</sup> Sporen pro Milliliter) (V1, V2, V3, V4)
- 0,02 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (+) zu Versuchsstart (1,72\*10<sup>6</sup> Sporen pro Milliliter) (V3, V4)
- Start-pH-Wert: 5,6
- Begasungsrate: 1,5 vvm
- Temperatur: 28 °C

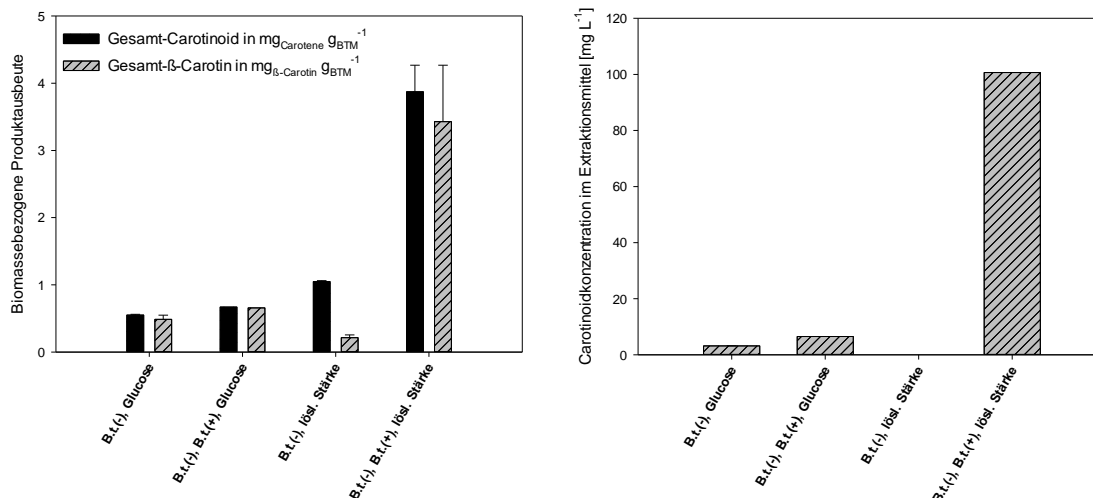


Abbildung 15. Links: Darstellung der ermittelten massebezogenen Ausbeuten an Carotinoiden und β-Carotin; Rechts: Darstellung der ermittelten Gesamt-Carotinoid-Konzentration im Extraktionsmittel zum Versuchsende (214h).

Tabelle 16. Auflistung der erreichten massebezogenen Carotinoid-Ausbeuten und der Konzentration an Carotinoiden im Extraktionsmittel bei unterschiedlichen C-Quellen-Einsatz.

Organismus	Temperatur [°C]	Substrat	BTM [g L <sup>-1</sup> ]	Ausbeute <sub>carotene</sub> [mg <sub>Carotene</sub> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]	Ausbeute <sub>β-carotin</sub> [mg <sub>β-Carotin</sub> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]	C <sub>Carotene,Extraktionsmittel</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]
B.t.(-)	28	Glucose	15,7 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,49 ± 0,06	3,16 ± 0,03
B.t.(-)	28	lösliche Stärke	2,60 ± 0,07	1,05 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0
B.t.(-) und B.t. (+)	28	Glucose	15,7 ± 0,02	0,67 ± 0,00	0,66 ± 0,00	6,50 ± 0,00
B.t.(-) und B.t. (+)	28	lösliche Stärke	2,37 ± 0,00	3,87 ± 0,39	3,43 ± 0,84	100,69 ± 0,00

Die in Abbildung 15 und Tabelle 16 dargestellten Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass die massebezogene Carotinoid-Ausbeute durch die Verwendung von löslicher Stärke als primäre Kohlenstoffquelle mehr als verdreifacht werden konnte. Die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute betrug bei der Monokultivierung des *B. trispora* Halbstammes  $0,55 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  (Glucose) und  $1,05 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  (lösliche Stärke). Im Vergleich dazu wurde eine Gesamt-Carotinoid-Ausbeute von  $0,67 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  (Glucose) und  $3,87 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  (lösl. Stärke) detektiert, welches mit dem Faktor 1,22 (Mono- vs. Mischkultivierung mit Glucose) und 3,69 (Mono- vs. Mischkultivierung mit löslicher Stärke) höher lag. Gegenüber der Monokultivierung konnte extrazelluläres Carotinoid bis zu  $100,69 \text{ mg L}^{-1}$  detektiert werden. Dies entspricht eine 31,86 fache Erhöhung gegenüber der Monokultivierung.

#### 4.6.2. Untersuchung zu möglichen Auswirkungen auf die Produktbildung durch gezielte Temperaturänderung (Temperaturshift)

In diesem Abschnitt des Arbeitspaketes 4 wurde der Einfluss eines gezielten Temperaturshifts auf die intrazelluläre Produktbildung sowie die Ausschleusung des  $\beta$ -Carotins in die Extraktionsphase untersucht. Die Kultivierungsparameter sind im Folgenden aufgelistet:

- Startkonzentration der C-Quelle:  $25 \text{ g L}^{-1}$  lösliche Stärke
- 2 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (-) zum Versuchsstart ( $1,19 \cdot 10^6$  Sporen pro Milliliter)
- 0,02 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (+) zu Versuchsstart ( $1,72 \cdot 10^6$  Sporen pro Milliliter)
- Start-pH-Wert: 5,6
- Begasungsrate: 1,5 vvm
- Start-Temperatur:  $28 \text{ }^\circ\text{C}$

Nach einer Kultivierungszeit von 24 h wurde der jeweilige Temperaturshift auf  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der *Blakeslea*-Pilz in der exponentiellen Wachstumsphase. Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass der Temperaturshift von  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  positiven Einfluss auf die morphologische Myzelausbildung, die Produktausbeute sowie die Produktausschleusung hatte. Ein deutlich feineres Pilzmyzel und eine geringere Biomasseanhaftung an den Glaswänden wurden beobachtet (Abbildung 16). Aufgrund des feineren Pilzmyzels lag eine größere Oberfläche vor, welches zu einem besseren Stoffaustausch führte.

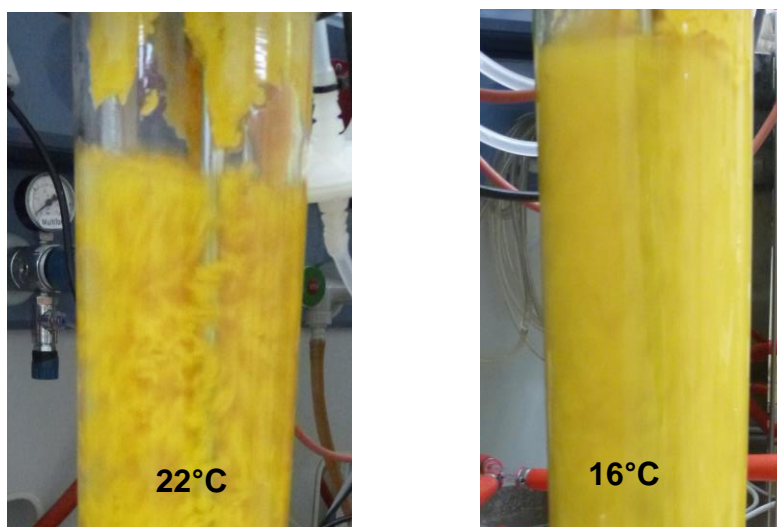


Abbildung 16. Darstellung der Pilzmorphologie während des Kultivierungsprozesses. Links: Temperaturshift von  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Rechts: Temperaturshift von  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Konzentration an Biomasse lag bei  $6,15 \text{ g L}^{-1}$  ( $22^\circ\text{C}$ ) und  $10,75 \text{ g L}^{-1}$  ( $16^\circ\text{C}$ ), wie in Tabelle 17 dargestellt. Die Differenz kam durch die Biomasseablagerungen an der Reaktorwand zustande, welches bei der Probenahme (Reaktormitte) nicht mit erfasst werden konnte. Die biomassebezogene Carotinoid-Ausbeute lag bei  $0,71 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  ( $22^\circ\text{C}$ ) und bei  $0,93 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  ( $16^\circ\text{C}$ ). Durch die Maßnahme eines Temperaturshiftes auf  $16^\circ\text{C}$  konnte im Vergleich zum Temperaturshift auf  $22^\circ\text{C}$  die biomassebezogenen Ausbeuten um die Faktoren 1,31 und 1,41 ( $0,22 \text{ mg}_{\text{Carotene}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ;  $0,2 \text{ mg}_{\beta\text{-Carotin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) gesteigert werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine niedrige Kultivierungstemperatur die Ausscheidung des Zielproduktes begünstigt. So wurde über den Versuchszeitraum von 214 h  $4,77 \text{ mg}_{\text{Carotene}} \text{ L}^{-1}$  ( $22^\circ\text{C}$ ) und  $110,34 \text{ mg}_{\text{Carotene}} \text{ L}^{-1}$  ( $16^\circ\text{C}$ ) vom Pilz an die Kulturbrühe abgegeben.

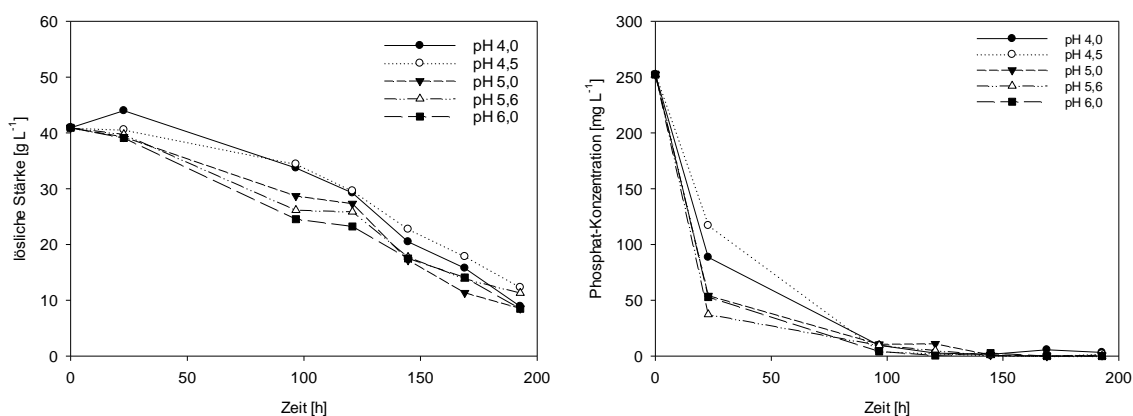
**Tabelle 17. Auflistung der ermittelten massebezogenen Carotinoid-Ausbeuten und der Konzentration an Carotinoiden im Extraktionsmittel nach einem definierten Temperatur-shift.**

Organismus	Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]	BTM [ $\text{g L}^{-1}$ ]	Ausbeute <sub>carotene</sub> [ $\text{mg}_{\text{Carotene}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]	Ausbeute <sub><math>\beta</math>-carotin</sub> [ $\text{mg}_{\beta\text{-Carotin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]	C <sub>Carotene,Extraktionsmittel</sub> [ $\text{mg L}^{-1}$ ]
B.t.(-) und B.t (+)	28 --> 22	$6,15 \pm 1,82$	$0,71 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,02$	$4,77 \pm 3,83$
B.t.(-) und B.t (+)	28 --> 16	$10,75 \pm 0,54$	$0,93 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,05$	$110,34 \pm 4,60$

Auf Basis der generierten Daten wird zur Gewinnung des intrazellulär akkumulierten Zielproduktes im weiteren Untersuchungsverlauf ein Temperaturshift von  $28^\circ\text{C}$  auf  $16^\circ\text{C}$  eingestellt.

#### 4.6.3. Ermittlung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum und der Produktsynthese

Während der Kultivierungsansätze im Schüttelkolbensystem wurde vorab festgestellt, dass das Pilzwachstum bei einem pH-Wert zwischen 5,6 und 5,8 am zügigsten vonstattengeht. Folglich wurden weitere Untersuchungen zur Ermittlung des optimalen pH-Wertes während der Produktbildungsphase vorgenommen. In den dafür durchgeführten Schüttelkolbenansatz wurde nach der Wachstumsphase zum Eintritt der Stickstoff- und Phosphatlimitation der pH-Wert angepasst. Die Produktbildung bei einem pH-Wert von 4,0; 4,5; 5,0; 5,6 und 6,0 wurde in den Versuchen betrachtet. Bei einem pH-Wert über 6,0 wurde im Vorfeld eine Verseifung des eingesetzten Sonnenblumenöls festgestellt. Durch die Zugabe von Lauge (NaOH) zur pH-Wert-Korrektur wird der Prozess der Verseifung begünstigt. Durch die Viskositätsänderung, welche durch die Verseifung hervorgerufen wurde, konnte kein Produktübergang aus dem intrazellulären Raum festgestellt werden.



**Abbildung 17. Darstellung des Verlaufes der Konzentration an lösliche Stärke (Links) und vom Phosphat- (Rechts) im Versuchszeitraum von 119 h bei unterschiedlichen pH-Werten.**

In Abhängigkeit des pH-Wertes wurde eine erhöhte Produktsynthese in *B. trispora* bei einem pH-Wert von 5,6 und 6,0 festgestellt. Demnach können durch eine pH-Wert-Regulierung die Enzymaktivitäten in der Carotinoigenese gesteuert werden. Ebenfalls konnte bei einem pH-Wert von 5,6 die höchste Phosphat-Verbrauchsrate von 9,43 mg h<sup>-1</sup> detektiert werden. Damit zeigten die Versuche bei pH 5,6 die schnellste Biomasseakkumulierung und folglich den schnellsten Eintritt der Phosphatlimitation. Der Verlauf der Konzentration an löslicher Stärke der einzelnen Versuchsansätze zeigte keine großen Standardabweichungen untereinander. Demgegenüber zeigten die Carotinoidkonzentrationen erhebliche Unterschiede im Vergleich untereinander (Tabelle 18). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Kohlenstoffquelle über den Mevalonatweg und der Carotinoidbiosynthese direkt weiter zur Trisporinsäure metabolisiert oder über einen anderen Stoffwechselweg als Energielieferant genutzt wurde.

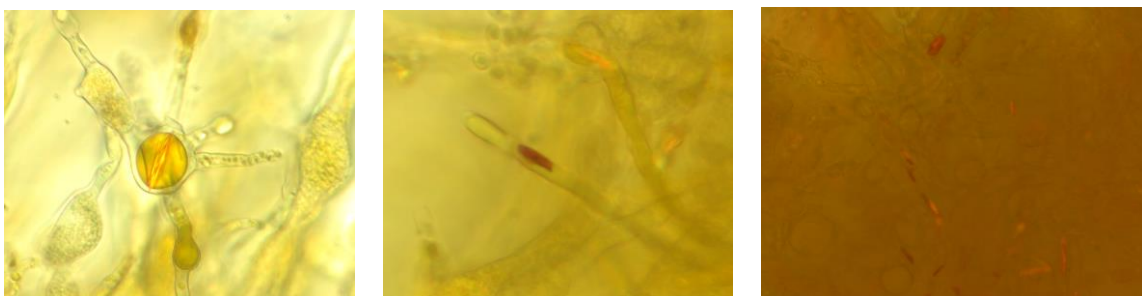
Bei einem pH-Wert zwischen 5,6 und 6,0 wurden die höchsten Produktausbeuten und Konzentrationen an Carotinoide ermittelt (Tabelle 18). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Produktabgabe an das Extraktionsmittel vermehrt bei einem pH-Wert zwischen 5,6 und 6,0 stattfand. Bei einem pH-Wert von 5,6 wurde die höchste Gesamtausbeute an Carotinoiden unter Einbezug der Konzentration an Carotinoiden in der Extraktionsphase von 12,27 mg g<sub>BTS</sub><sup>-1</sup> erreicht. Gegenüber den anderen Kultivierungsansätzen mit pH-Wert 4,0, 4,5, 5,0 und 6,0 liegt die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute dieses Versuchsansatzes (pH-Wert 5,6) um den Faktor 1,5 bis 4,5 höher.

Folglich wurden alle weiteren Versuchsansätze bei einem pH-Wert von 5,6 bis 5,8 gefahren. Dies birgt den Vorteil, dass kein pH-Shift während des Kultivierungsvorganges vorgenommen werden muss.

**Tabelle 18. Darstellung der Produktausbeuten an Carotinoiden bei unterschiedlichen pH-Werten während der Produktsynthese in *Blakeslea trispora*.**

pH-Wert	W <sub>Carotene</sub> Mittelwert [%]	C <sub>carotene</sub> Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ]	Ausbeute <sub>Carotene</sub> [mg <sub>β-Carotin</sub> g <sub>BTS</sub> <sup>-1</sup> ]	Gesamt- Produktivität [mg <sub>β-Carotin</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	C <sub>Carotene, Extraktionsmittel</sub> Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ]	Ausbeute <sub>Carotene, Extraktionsmittel</sub> [mg <sub>β-Carotin</sub> g <sub>BTS</sub> <sup>-1</sup> ]	Gesamt-Ausbeute Carotene [mg <sub>β-Carotin</sub> g <sub>BTS</sub> <sup>-1</sup> ]
4,0	0,27	39,92	2,69	0,21	2,39	0,1613	2,86
4,5	0,19	28,81	1,94	0,15	10,99	0,7415	2,69
5,0	0,30	53,21	2,98	0,28	12,62	0,7072	3,69
5,6	1,15	216,98	11,46	1,13	15,29	0,8077	12,27
6,0	0,69	194,29	6,87	1,01	32,11	1,1348	8,00

In den vorgenommenen Untersuchungen wurden erstmals kristalline Strukturen akkumuliert und in der Pilzbiomasse detektiert (pH-Wert 5,6 und 6,0) (Abbildung 18). Auffällig war, dass die Kristalle unterschiedliche Farbgebung von hell-Orange bis tief-Rot aufwiesen. Dies deutet auf das Vorhandensein von β-Carotin und dessen Vorstufen, insbesondere ζ-Carotin hin.



**Abbildung 18. Mikroskopische Aufnahmen von Carotinoid-Kristallen im Pilzmyzel mit unterschiedlicher Farbgebung gelöst in Extraktionsmittel oder frei im Myzel vorliegend.**



Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten zudem das vom Pilz aufgenommene Extraktionsmittel angereichert mit Carotinoiden. Demnach ist der Übergang des Extraktionsmittels durch die Zellmembran in das Pilzmyzel erfolgt. Mikrobiologische Untersuchungen inwiefern Membranproteine an einem Stoffübergang beteiligt sind und ob ein aktiver oder passiver Transport erfolgt sind in weiteren Untersuchungen notwendig. Die Fragestellung des Vorhandenseins von hydrophoben Poren muss ebenfalls in vertieften molekularbiologischen Untersuchungen vorgenommen werden.

Im Weiteren konnten Myzelbereiche des *Blakeslea trispora* (-) Halbstammes, welche eine hohe Carotinoide-Akkumulierung aufwiesen, mikroskopisch isoliert und nachfolgend ausplattiert werden. Dadurch konnte eine Steigerung des intrazellulären Carotinoide-Massenanteils von ursprünglich 0,24 % auf 3,91 % und somit eine Erhöhung der biomassebezogenen Produktausbeute von 0,029 mg<sub>Carotinoide</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> auf 39,05 mg<sub>Carotinoide</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> (888,28 mg<sub>Carotinoide</sub> L<sup>-1</sup>) erzielt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich demnach nicht mehr um den genetisch identischen *Blakeslea trispora* (-) Halbstamm handelt. Dies muss zukünftig durch eine Genomsequenzierung und dessen Gegenüberstellung der Genomsequenz mit dem des ursprünglichen Pilzhalbstammes aufgeklärt werden.

#### **4.6.4. Ermittlung des spezifischen Leistungseintrages und der Einflussgröße Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ) in Abhängigkeit der Begasungsrate**

Im ersten Abschnitt des Arbeitspaketes wurde der Einfluss der Scherbeanspruchung im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Dazu wurden Schüttelkolben ohne und bestückt mit Schikanen verwendet. Durch die Schikanen wurde die Kreisströmung unterbrochen und damit zum einen der Sauerstoffeintrag erhöht und zum anderen die Durchmischung sowie die Nährstoffverfügbarkeit verbessert. Welchen Einfluss diese Maßnahme auf die Produktbildung und Produktausschleusung hatte, wurde in einer Mehrfachbestimmung untersucht.

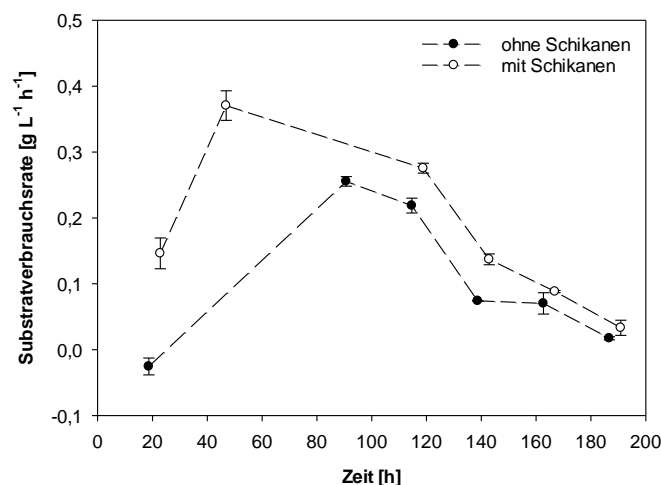
Die Resultate zeigen auf, dass durch den Einsatz von Schikanen im Kultivierungssystem neben der feineren Myzelverteilung auch die Produktausbeuten mehr als verdreifacht werden konnten. Die biomassebezogenen Produktausbeute (Tabelle 19) mit Schikanen lag mit dem Faktor 3,7 höher. Weiterhin konnte die Gesamt-Produktivität in einem Kultivierungszeitraum von 190 h verdreifacht werden. Zum Versuchsende konnte aufgrund der besseren Verteilung des Extraktionsmittels im System eine Carotinoide-Konzentration in der Extraktionsphase von 133,33 mg L<sup>-1</sup> detektiert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die extrazelluläre Gewinnung von Carotinoiden vom Leistungseintrag im System abhängig ist. Dabei muss eine Balance gefunden werden, die optimale extrazelluläre Produktgewinnung erlaubt und zugleich eine irreparable Schädigung des Pilzmyzels vermeidet.

**Tabelle 19.** Darstellung der Resultate aus den Versuchsansätzen mit *B. trispora* ohne und mit eingebauten Schikanen im Schüttelkolben.

Schüttelkolben	BTM [g L <sup>-1</sup> ]	P/X [mg <sub>Carotene</sub> g <sub>BTS</sub> <sup>-1</sup> ]	Gesamt- Produktivität [mg <sub>Carotene</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	C <sub>Carotene,E</sub> Mittelwert [mg L <sup>-1</sup> ]
ohne Schikane	29,74 ± 0,6	8,26 ± 0,24	0,95 ± 0,04	9,42 ± 0,00
mit Schikane	26,63 ± 3,87	30,53 ± 8,51	2,68 ± 0,37	133,33 ± 23,9

Der positive Einfluss des höheren Leistungseintrages ließ sich auch bei der Betrachtung der Substratverbrauchsrate (Abbildung 19) verdeutlichen. Der Kurvenverlauf ohne Schikaneneinsatz verläuft über den gesamten Versuchszeitraum unterhalb der Kurve mit Schikaneneinsatz. Während der Wachstumsphase (bis 48 h) wurde der höchste Substratverbrauch von 0,37 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (mit Schikane) und 0,26 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (ohne Schikane) detektiert. Nach Eintritt der Limitation fand eine Abflachung der Substratverbrauchsrate in beiden Fällen statt, welches auf die Einlagerung von Carotinoiden und die damit ausgelöste Produktinhibierung zurückzuführen ist.

Einen weiteren Einfluss auf die Produktbildung hat die höhere Verfügbarkeit von Sauerstoff im System. Durch einen erhöhten oxidativen Stress wurde verstärkt die Synthese von Carotinoiden angeregt. Die Carotinoide wirken als nichtenzymatische Antioxidantien und neutralisieren Sauerstoffradikale<sup>2</sup>.



**Abbildung 19.** Darstellung der Substratverbrauchsrate von *B. trispora* mit und ohne Schikanen im Schüttelkolben bei einer Schüttelfrequenz von 145 rpm und einer Kultivierungstemperatur von 22°C bis zum Versuchsende (190 h).

Die Untersuchungen zum Einfluss des Leistungseintrages und der Sauerstoffversorgung wurden in einem Blasensäulensystem mit unterschiedlichen Begasungsraten vorgenommen. Die Startkultivierungsbedingungen waren wie folgt:

- Begasungsrate: 1,0; 1,5, 2,0 und 2,5 vvm
- Startkonzentration der C-Quelle: 40 g L<sup>-1</sup> lösliche Stärke
- 10 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (-) zum Versuchsstart (1,29\*10<sup>6</sup> Sporen pro Milliliter)
- 0,2 mL Zugabe einer Sporensuspension an B.t. (+) zu Versuchsstart (1,82\*10<sup>6</sup> Sporen pro Milliliter)
- Start-pH-Wert: 5,8

➤ Start-Temperatur: 28 °C → Temperaturshift nach 24 h

Im Folgenden ergab sich für das Blasensäulensystem eine empirische Berechnungsgleichung für den volumenbezogener Stoffübergangskoeffizienten für Sauerstoff  $k_{La}$  auf Basis der Begasungsraten von:

$$y = 66,311 * x$$

mit

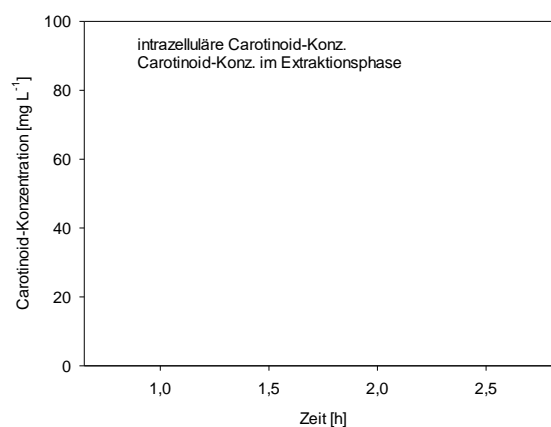
$y$  = volumenbezogener Stoffübergangskoeffizienten  $k_{La}$  [ $h^{-1}$ ]

$x$  = Begasungsrate [vvm]

Die in Tabelle 20 dargestellten Resultate aus den Untersuchungen mit unterschiedlichen Begasungsraten zeigen auf, dass sowohl die intrazelluläre Carotinoid-Akkumulierung sowie die Produktauscheidung in die native Extraktionsphase von der Begasungsintensität und somit vom Sauerstoffeintrag und der Suspendierung abhängig sind. Es konnte mit einer Begasungsrate von 2,0 vvm eine biomassebezogene Carotinoid-Ausbeute von  $3,15 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erreicht werden. Demgegenüber lag die massebezogene Carotinoid-Ausbeute bei einer Begasungsrate von 1,0 vvm bei  $2,57 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und damit mit einen Faktor von 1,23 darunter. Die höchsten extrazellulären Carotinoid-Konzentrationen in der nativen Extraktionsphase lieferten die Versuchsansätze mit einer Begasungsrate von 2,0 vvm ( $53,68 \text{ mg L}^{-1}$ ) und 2,5 vvm ( $49,20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Die Resultate spiegeln die Ergebnisse aus den Schüttelkolbenversuchen wieder.

**Tabelle 20. Darstellung der massebezogenen Produktausbeuten und der Gesamt-Carotinoid-Konzentration in der Extraktionsphase bei unterschiedlichen Begasungsraten.**

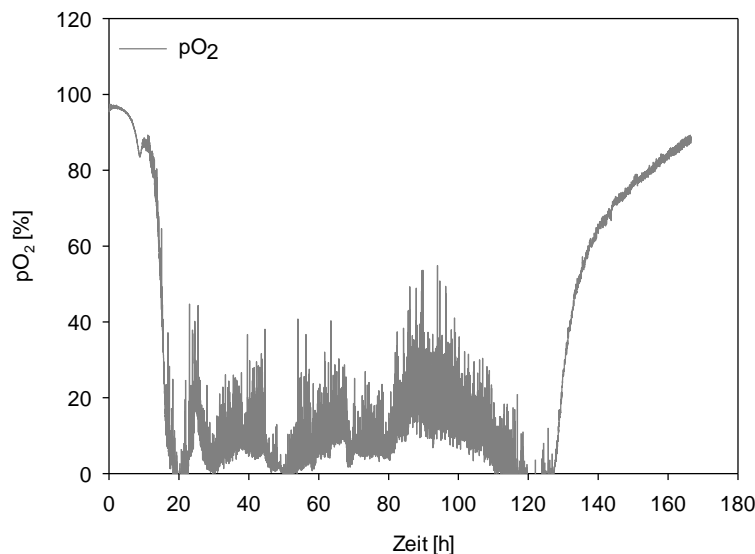
Begasungsrate [vvm]	$k_{La}$ [ $h^{-1}$ ]	Massenanteil $\omega$ [%]	$C_{\text{carotene}}$ Mittelwert [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	Ausbeute [ $\text{mg}_{\text{Carotene}}$ $\text{g}_{\text{BTS}}^{-1}$ ]	$C_{\text{Carotene,E}}$ Mittelwert [ $\text{mg L}^{-1}$ ]
1	66,31	0,26	64,25	2,57	34,25
1,5	99,47	0,28	70,35	2,81	40,57
2	132,62	0,31	78,65	3,15	53,68
2,5	165,78	0,31	78,12	3,12	49,20



**Abbildung 20. Darstellung der Ausbeuten an Gesamt-Carotinoiden im Pilzmyzel und die Carotinoid-Konzentration im Extraktionsmittel (Sonnenblumenöl) bei unterschiedlichen Begasungsraten.**

In Abbildung 21 ist der  $pO_2$ -Gehalt (Gelöstsauerstoffgehalt) im Reaktorsystem bei der gemeinsamen Kultivierung der beiden *B. trispora* Halbstämme über einen Versuchszeitraum von 166 h dargestellt. Die Wachstumsphase bis 20 h (bei 2,0 vvm) ist durch einen Abfall des Sauerstoffgehaltes im System geprägt. Dem Folgend findet eine Stagnation des Sauerstoffgehaltes statt, verschuldet durch auftretende Nährstofflimitationen (N und P). Bis zu einem Versuchszeitraum von 130 h findet die Carotinoigenese im Pilz statt. Gleichzeitig wird ein Teil des intrazellulär gebildeten Carotinoids durch Auftreten eines Konzentrationsgradienten an die Extraktionsphase abgegeben. Dieser Effekt wird durch die Aufhebung der Nährstofflimitation verstärkt. Parallel zur Abgabe der Carotinoide an die extrazelluläre Lipidphase findet die Carotinoigenese weiterhin im Pilzmyzel statt. Nach aktuellem Wissenstand findet die Abgabe der Carotinoide bis zum Erreichen einer Gleichgewichtskonzentration zwischen den intrazellulären und extrazellulären Raum statt. Demnach würde die Carotinoid-Konzentration im Extraktionsmittel bei der Kultivierung eines Hochleistungsstammes deutlich höher ausfallen.

Nach einer Kultivierungszeit von ca. 130 h nimmt der Gelöstsauerstoffgehalt im Reaktorsystem zu. Dies kann durch die Verringerung der Stoffwechselaktivität der Pilz-Halbstämme begründet werden. Im Laufe der Carotinoigenese findet eine Einlagerung von Carotinoiden im Pilzmyzel statt. Beim Erreichen einer bestimmten intrazellulären Konzentration werden die Stoffwechselwege inhibiert (Produktinhibierung), welche zu einer kontinuierlichen Verringerung der Stoffwechselaktivität und damit zur Senkung des Sauerstoffbedarfes führt.



**Abbildung 21.** Darstellung eines typischen Kurvenverlaufes vom Sauerstoffgehalt im Blasensäulensystem bei einer Begasungsrate von 2,0 vvm bei der Kultivierung der (+) und (-) *Blakeslea trispora* Halbstämme über den Versuchszeitraum von 167 h.

Im Folgenden wurden die spezifischen Leistungseinträge für definierte Begasungsraten berechnet und gegenübergestellt. Für die Ermittlung des spezifischen Leistungseintrages für verschiedene Begasungsraten wurde die Gleichung nach Liepe (1988) angewendet. Diese bezieht sich auf die Expansionsleistung der Gasblasen und wird mit folgender Gleichung berechnet.

$$P_{exp} = m_i * R * T * \ln\left(\frac{p_S}{p_K}\right) = \rho * V * R * T * \ln\left(\frac{p_S}{p_K}\right) = p_L * \dot{V} * \ln\left(\frac{p_S}{p_K}\right)$$

mit

$p_L$ =Druck in der Luftzuluft [bar]

$p_S$ =Druck im Reaktorsockel [bar]

$p_K$ =Druck im Reaktorkopf [bar]

$\dot{V}$ =Volumenstrom [L min<sup>-1</sup>]

Der Druck in der Luftzuluft ( $p_L$ ) lag konstant bei 2 bar. Der Druck im Reaktorsockel ( $p_S$ ) ergab sich aus der Summe des Umgebungsdruckes (1,01325 bar) und dem vorherrschenden Druck der Wassersäule (Fermentationsbrühe) (0,0489 bar). Am Reaktorkopf ( $p_K$ ) herrschte der Atmosphärendruck von 1,01325 bar. Die auf Grundlage der Berechnungsgleichung sich ergebenden spezifischen Leistungseinträge ( $\bar{\epsilon}$ ) für die einzelnen Begasungsraten sind in Tabelle 21 aufgelistet.

**Tabelle 21. Auflistung der berechneten spez. Leistungseinträge für unterschiedliche Begasungsraten im verwendeten Blasensäulensystem.**

Begasungsrate [vvm]	$P_{exp}$ [W]	$\bar{\epsilon}$ [W m <sup>-3</sup> ]
1,0	0,00157	1,57
1,5	0,00236	2,36
2,0	0,00314	3,14
2,5	0,00393	3,93

Die Resultate der Versuchsansätze im Blasensäulensystem zeigen auf, dass mit steigenden spez. Leistungseintrag die intrazelluläre Carotinoid-Akkumulierung und der Übergang des intrazellulär akkumulierten Carotinoides in die Extraktionsphase begünstigt wird. Dies sind auf einen höheren  $k_{LA}$ -Wert, die damit verbundenen Stoffaustauschgrenzflächen, die bessere Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit sowie die intensivere Verteilung des nativen Extraktionsmittels (kleinere Blasen) zurückzuführen.

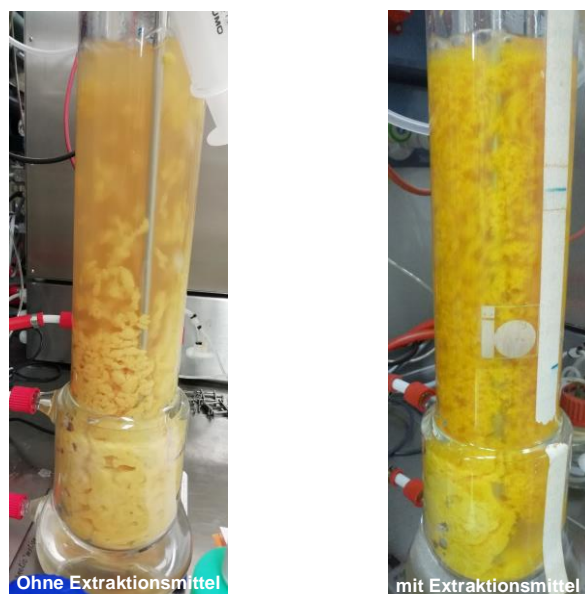
Es zeigte sich, dass mit steigendem spez. Leistungseintrag der Übergang der Carotinoide in die native Extraktionsphase verstärkt wird. Die im Blasensäulensystem detektierten Carotinoid-Konzentrationen liegen unterhalb der Resultate, welche im Schüttelkolbensystem generiert wurden. Dies liegt zum einen an den vorherrschenden Kultivierungsbedingungen. Im Erlenmeyerkolben findet bei 145 rpm in Kombination mit Schikanen ein höherer Leistungseintrag statt. Diese nimmt wiederum Einfluss auf die Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit und damit auf die Produktsynthese und Produktausschleusung. So kann nach bisherigem Wissenstand die intrazellulären und extrazellulären Carotinoid-Ausbeuten mit steigenden spez. Leistungseintrag erhöht werden. Bis zu welchem Maß dies geschehen kann, muss in weiteren Versuchsansätzen in anderen Reaktorsystemen z.B. Rührreaktor oder Tauchstrahlreaktor und mit Hochleistungsstämmen untersucht werden.

#### **4.6.5. Ermittlung des optimalen Zeitpunkts der Zugabe von Extraktionsmittel zur In-Situ-Produktisolierung**

Das Arbeitspaket beinhaltete die Ermittlung eines geeigneten Zeitpunktes der Zugabe des nativen Extraktionsmittels. Die Betrachtung des Wachstums und der Produktbildung mit Hauptaugenmerk auf die Ausschleusung des Zielproduktes wurde vorgenommen. Dafür wurde ein Doppelversuchsansatz mit Zugabe des Extraktionsmittels von Versuchsstart an durchgeführt. Bei der zweiten Doppelbestimmung

wurde kein Extraktionsmittel vor und während der Wachstumsphase zugegeben. Dieses sollte nach Eintritt der Nährstofflimitation zugegeben werden.

Es zeigte sich, dass die Pilzbiomasse in den Versuchsansätzen ohne Extraktionsmittel im unteren Bereich des Reaktorsystems stark agglutinierte und eine unzureichende Verteilung der Biomasse im System stattfand. Daraus resultierte eine geringe Stoffaustauschfläche, welche wiederum zu einer langsameren Biomasse- und Produktbildung führte. Zudem kam der Bewuchs der pH-Sonde und des Probenahmestutzens mit Pilzbiomasse, sodass eine genaue pH-Wert-Messung sowie eine repräsentative Probenahme nicht durchführbar waren. Aus den Resultaten kann geschlossen werden, dass in dem Blasensäulensystem zur verbesserten Biomasseverteilung der Einsatz von Extraktionsmittel eine wichtige Rolle spielt. Die Versuche mit Extraktionsmittel von Beginn an zeigten ein zügiges Wachstum und eine gute Biomasseverteilung im Reaktorsystem.



**Abbildung 22. Vergleich der Biomasseausbildung im Reaktorsystem ohne Extraktionsmittel (Links) und mit Extraktionsmittel (Rechts) von Versuchsbeginn an.**

In den Versuchsansätzen mit Extraktionsmittel wurde ein  $\beta$ -Carotin-Massenanteil von 0,242 % erreicht (Tabelle 22). Dies entspricht einem prozentualen Anteil des Gesamt-Carotinoid-Massenanteils von 93,7 % und liegt mit dem Faktor 6,37 höher als die erreichten  $\beta$ -Carotin-Massenanteile in den Versuchen ohne Extraktionsmittel (0,038 %). Eine mögliche Ursache ist die morphologische Entwicklung des Pilzes während der Wachstumsphase. So war die Stoffaustauschfläche für Nährstoffe und Sauerstoff im System ohne Extraktionsmittel aufgrund der Biomasse-Agglomeration geringer. Dies führte zu einer verminderten Carotinoidsynthese. Es zeigte sich weiterhin, dass die Myzeloberfläche ausschlaggebend für die Ausschleusung der Carotinoide in die Extraktionsphase war. Mit Extraktionsmittel konnte zum Versuchsende eine Konzentration an Carotinoiden in der Extraktionsphase von  $20,28 \text{ mg L}^{-1}$  detektiert werden. Dies entsprach das 2,45 fache der erreichten Konzentration an Carotinoiden in den Versuchen ohne Extraktionsmittel während der Wachstumsphase.

**Tabelle 22. Darstellung der erreichten Carotinoid- und  $\beta$ -Carotin-Massenanteile in der Biomasse und der Konzentration an Carotinoiden in der Extraktionsphase.**

Bezeichnung	Carotinoid-Massenanteil [%]	$\beta$ -Carotin-Massenanteil [%]	Carotinoidkonz. im Extraktionsmittel [mg L <sup>-1</sup> ]
ohne Extraktionsmittel	0,043 $\pm$ 0,012	0,038 $\pm$ 0,011	8,26 $\pm$ 0,88
mit Extraktionsmittel	0,258 $\pm$ 0,037	0,242 $\pm$ 0,053	20,28 $\pm$ 4,87

#### 4.7. Produktaufarbeitung (Biomassephase, Lösungsmittelphase, Kristalle) (AP 7)

Im laufenden Forschungsvorhaben wurde eine Carotinoid-Analytik etabliert und in die Laborroutine übernommen (siehe angewendete Methoden). Nach der Behandlung der einzelnen Phasen (Biomasse, wässrige Phase und Ölphase) konnten quantitative und qualitative Aussagen über die Konzentration und Zusammensetzung der isolierten Carotinoide getroffen werden. Im weiteren Projektverlauf wurde das Verhältnis zwischen Gesamt-Carotinoid-Gehalt zum Gesamt-Lipidgehalt (Biomasse) durch eine Fettanalytik (Soxhlet-Extraktion) unter optimalen Kultivierungsbedingungen ermittelt. Dazu wurde eine Fünffachbestimmung im Blasensäulensystem unter optimalen Bedingungen vorgenommen.

Im System lag zum Versuchsende eine mittlere Lipidkonzentration von  $0,39 \pm 0,07 \text{ g}_{\text{Lipide}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  vor. Der Anteil der Gesamt-Carotinoide betrug  $5,87 \pm 1,13 \%$  ( $22,14 \pm 1,22 \text{ mg}_{\text{Carotene}} \text{ BTM}^{-1}$ ). Dies verdeutlicht, dass der Großteil des gebildeten Acetyl-CoA nicht in den Mevalonatweg und anschließend in die Carotinoigenese eingeht, sondern verstärkt den Weg in die Fettsäurebiosynthese bevorzugt. Dies führt wiederum zu geringeren Carotinoid-Ausbeuten. Demgegenüber kann möglicherweise die Enzymaktivität, welche das  $\beta$ -Carotin weiter zu Trisporsäure umsetzt, so hoch sein, dass das  $\beta$ -Carotin nur kurzweilig im Pilzmyzel akkumuliert wird.

Die im Bioprozess gewonnene carotinoidhaltige Biomasse kann in der etablierten Methoden weiter behandelt werden. So wird nach heutigem Stand der Technik die Biomasse abgetrennt mittels Zentrifuge bzw. Dekanter, gewaschen, unter Lichtausschluss schonend getrocknet und anschließend als Futtermittel vermarktet oder die hochpreisigen Carotinoide nach vorhergehenden Zellaufschluss mittels Lösungsmittelextraktion gewonnen und weiteren Applikation (Lebensmittelzusatzstoff) zugeführt. Die Trennung der wässrigen Phase und der nativen Extraktionsphase erfolgte durch Zentrifugation, sodass weitere kosten- und zeitauswendige Trennschritte wegfielen.

Die in diesem neuartigen Verfahren anfallende carotinoidhaltige native Extraktionsphase kann nach notwendiger vorrangegangener Bewertung der Food and Drug Administration (FDA) als Nahrungsergänzungsmittel in Kapselform vermarktet werden. In dieser Form werden bereits eine Vielzahl von carotinoidhaltigen Nutrients durch unterschiedliche Anbieter der Bevölkerung zur Verfügung gestellt.

Das Vorkommen von Carotinoid-Kristallen im verwendeten nativen Extraktionsmittel konnte bei mikroskopischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine mögliche Ursache sind die verwendeten *B. trispora* Wildtypstämme. Diese schlagen gegenüber Hochleistungsstämmen nach Eintritt der Nährstofflimitation vorzugsweise den Weg der Fettsäurebiosynthese ein. Dennoch konnte die Ausschleusung von Carotinoiden an die Extraktionsphase (bis zu  $133 \text{ mg L}^{-1}$ ) sowie die parallele Neusynthese und Akkumulierung von Carotinoiden im Pilzmyzel nachgewiesen werden. Die

Kristallisation der Carotinoide im Extraktionsmittel kann erst beim Erreichen der Sättigungsgrenze des Extraktionsmittels mit Carotinoiden erfolgen. Untersuchungen zeigten, dass die Sättigungsgrenze in Sonnenblumenöl bei 2800 mg L<sup>-1</sup> liegt. Das Erreichen der Sättigungsgrenze ist folglich durch bspw. der Verwendung von *B. trispora* Hochleistungsstämmen möglich, da diese bis zu 8 g<sub>Carotene</sub> L<sup>-1</sup> erreichen. Auf Basis der Dichteunterschiede der wässrigen Phase, der Extraktionsphase und der Carotinoidekristalle kann die Trennung der Kristallfraktion zukünftig durch Zentrifugation erfolgen.

## 5. Diskussion

*Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht?*

In nachfolgender Tabelle sind die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse entsprechend den Arbeitspaketen und Meilensteinen zusammengestellt:

Arbeitspakete (AP)	Bearbeitungsstand
AP 1. <b>Ermittlung effizienter Limitationsbedingungen für die Carotinoidebildung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Festlegung einer optimalen Nährstofflimitation wurde abgeschlossen</li> <li>• Ermittlung der optimalen Grenzkonzentration mit höchster Produktausbeute abgeschlossen</li> <li>• Auswahl eines geeigneten Produktionsstammes abgeschlossen</li> </ul>
AP 2. <b>Festlegung geeigneter Kohlenstoffquellen und Substitution konventioneller Extraktionsmittel durch Speiseöle</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testung von Mono- und Mischsubstratkultivierung abgeschlossen</li> <li>• Festlegung eines geeigneten Extraktionsmittels abgeschlossen</li> </ul>
AP 3. <b>Bestimmung der Konzentrationsunterschiede von Kationen / Anionen in der Extraktionsphase und der wässrigen Phase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ermittlung einer möglichen Einflussnahme auf die Anionen- und Kationen-Konzentration aller getesteten Extraktionsphasen abgeschlossen</li> </ul>
AP 4. <b>Bestimmung optimaler Medienbedingungen für die Produktbildung und- freisetzung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testung der Einflussnahme von Nährsalzen und Vitaminen auf die Produktbildung wurde abgeschlossen</li> <li>• Ermittlung eines optimalen Volumenverhältnisses zwischen der wässrigen- und der Extraktionsphase abgeschlossen</li> </ul>
AP 5. <b>Ermittlung der apparativen und verfahrenstechnischen Bedingungen für die Maßstabsübertragung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testung der einzelnen Reaktorsysteme (Multifors, Blasensäulensystem) für die Maßstabsübertragung wurde abgeschlossen.</li> <li>• Festlegung eines geeigneten Kultivierungssystems (Blasensäulensystem) unter Einbezug der morphologischen Entwicklungsphasen wurde abgeschlossen.</li> </ul>
AP 6. <b>Bioprozessentwicklung/Bioprozessführung mit In-situ-Produktgewinnung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ermittlung der optimalen Temperatur und des pH-Wertes zur verbesserten extrazellulären Produktgewinnung sind abgeschlossen.</li> <li>• Ermittlung des optimalen Zugabe-Zeitpunktes des Extraktionsmittels sowie die optimale Begasungsrate im Blasensäulensystem sind abgeschlossen.</li> </ul>



AP 7. <b>Produktaufarbeitung (Biomassephase, Extraktionsphase, Kristalle)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die optimale Strategie zur Produktaufarbeitung der Biomasse, der carotinoidhaltigen nativen Extraktionsphase sowie der Kristallfraktion wurden untersucht und sind abgeschlossen.</li> </ul>
<b>Meilenstein (M)</b>	<b>Erreichungsstand</b>
M 1 <b>Pilze und Hefen mit hoher Carotinoideausbeute wurden sondiert und eine geeignete Kohlenstoffquelle mit höchster Produktausbeute gefunden</b>	Vollständig erreicht: ein Vorzugsstamm und eine geeignete Kohlenstoffquelle mit höchstem Produktbildungspotential wurden aus den ermittelten Resultaten selektiert und der Meilenstein vollständig erfüllt.
M 2 <b>Festlegung des Kultivierungsmediums und des Ziel-Carotinoides</b>	Vollständig erreicht: ein Kulturmedium, auf dem ein optimales Wachstum und Produktbildung möglich ist, wurde selektiert. Das Ziel-Carotinoide mit höchster Wiederfindungsrate wurde aus den ermittelten Resultaten sondiert und der Meilenstein vollständig erfüllt.
M 3 <b>Optimierter Bioprozess für die In-situ-Produktgewinnung liegt vor.</b>	Vollständig erreicht: ein optimaler Zeitpunkt für die Zugabe des Extraktionsmittels wurde selektiert. Die Kultivierungsbedingungen (pH, Begasungsrate, Temperatur) im Blasensäulensystem wurden gefunden und der Meilenstein vollständig erfüllt.
M 4 <b>Festlegung des Abtrennungs- und Aufreinigungsverfahrens</b>	Vollständig erreicht: die optimale Abtrennung der carotinoidhaltigen Biomasse und der Extraktionsphase wurde untersucht und der Meilenstein vollständig erfüllt.

Im Einzelnen wurden die im Forschungsvorhaben gesetzten Ziele der Findung eines geeigneten Produktionsstammes (*Blakeslea trispora* Halbstämme (+) und (-)) mit höchster Produktausbeute (6,40 mg<sub>Carotinoide</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> und 2,61 mg<sub>β-Carotin</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>), der Entwicklung eines Kulturmediums (YpSs-Medium), welches ein optimales Wachstum und höchste Produktausbeuten mit sich bringt (**Meilenstein 1**), die Optimierung des Kultivierungsverfahrens durch Einsatz von Nährsalzen und Vitaminen sowie die Findung eines Ziel-Carotinoids (β-Carotin) mit hoher Wiederfindungsrate (**Meilenstein 2**) vollständig im vorgegebenen Zeitraum erfüllt.

Im weiteren Verlauf des Forschungsvorhabens wurden optimale Bedingungen für die Produktbildung und extrazelluläre Produktgewinnung (Temperaturshift 28 °C → 16 °C, Begasungsrate: 1,5 bis 2,0 vvm, pH-Wert: 5,6 bis 5,8) gefunden. Weiterhin konnte der Zeitpunkt der Extraktionsmittelzugabe, welche die höchsten Carotinoide-Ausbeuten erlauben, ermittelt werden (**Meilenstein 3**). Das Verhältnis zwischen intrazelluläre Lipid und Carotinoide-Konzentration wurde ermittelt und eine geeignete Abtrennmethode der Biomasse, hydrophilen und hydrophoben Phase wurde selektiert (**Meilenstein 3**) und die Arbeitspakete und Meilensteine vollständig im beantragten Projektzeitraum erfüllt.

*Woraus ergaben sich die Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse?*

Im laufenden Projekt wurden keine Abweichungen hinsichtlich der erwarteten Ergebnisse festgestellt.

*Wie gestaltet sich die Arbeit mit unterschiedlichen Kooperationspartnern?*

Das von der DBU geförderte Forschungsvorhaben wurde ausschließlich vom und am UFZ durchgeführt.

## 6. Öffentlichkeitsarbeit

*Wie werden die Ergebnisse veröffentlicht?*

Auf Grundlage der herausragenden Forschungsergebnisse wurde eine Patentschrift mit dem Titel „VERFAHREN ZUR GEWINNUNG EINES STOFFWECHSELPRODUKTES AUS PILZZELLEN“ vom UFZ angemeldet (EP20214921.7). Nach der Offenlegung der Patentanmeldung (nach 18 Monaten) soll die Veröffentlichung der Ergebnisse in Fachjournals erfolgen.

*Wer partizipiert an den Ergebnissen?*

Durch die vollständige apparative, verfahrenstechnische und mikrobielle Charakterisierung des Verfahrens kann für potentielle Endanwender ein vollständiges Konzept zum Ablauf des Bioprozesses bereitgestellt werden. Dies ermöglicht eine schnelle und effiziente Übertragung sowie Umsetzung des Prozesses bei dem jeweiligen Industriepartner. Potentielle Nutzer des Verfahrens, welches als Patent angemeldet wurde, können Firmen sein, die bereits eine eigene Fermentationsanlage besitzen bzw. Industriezweige die u.a. native Öle und zucker- oder stärkehaltigen Nebenproduktströme aufwerten möchten.

*Wird das Vorhaben über die Projektlaufzeit weitergeführt?*

Bereits vor dem erfolgreichen Abschluss des Forschungsprojektes wurde die UFZ-interne Weiterführung der Forschung mit dem Ziel der Verfahrensübertragung auf phototrophe Organismen (z.B. Algen) beantragt. UFZ-interne Untersuchungen sollen zudem der Anwendungserweiterung des In-Situ-Extraktionsverfahrens zur Gewinnung von anderen biologischen Farbstoffen, Vitaminen, Fettsäuren, biologisch abbaubare Kunststoffe und anderen pharmazeutisch aktiven Verbindungen dienen. Zudem könnten kommerzielle Produktionsverfahren durch das entwickelte Verfahren abgelöst werden, sodass der Beitrag zur Lösung der vorherrschenden Umweltprobleme zum Tragen kommt. Langfristiges Ziel dabei ist die Kommerzialisierung des entwickelten Verfahrens, insbesondere eine Verfahrensüberführung in den Produktionsmaßstab.

## 7. Fazit

*Hat sich die Vorgehensweise bewährt?*

Die im Projektantrag aufgeführten Arbeitspakete wurden im vorgegebenen Zeitraum vollständig erfüllt, sodass sich bis zum Projektende die Vorgehensweise bewährt hat.

*Werden Änderungen der Zielsetzung notwendig?*

Bezüglich der Vorhabensdauer wurde aufgrund der Corona-Pandemie-bedingten Arbeitseinschränkungen eine dreimonatige Nachtragsfinanzierung durch die DBU gewährt. Durch die Projektverlängerung waren Änderungen in der Zielsetzung des Forschungsvorhabens nicht notwendig.

## 8. Anhang

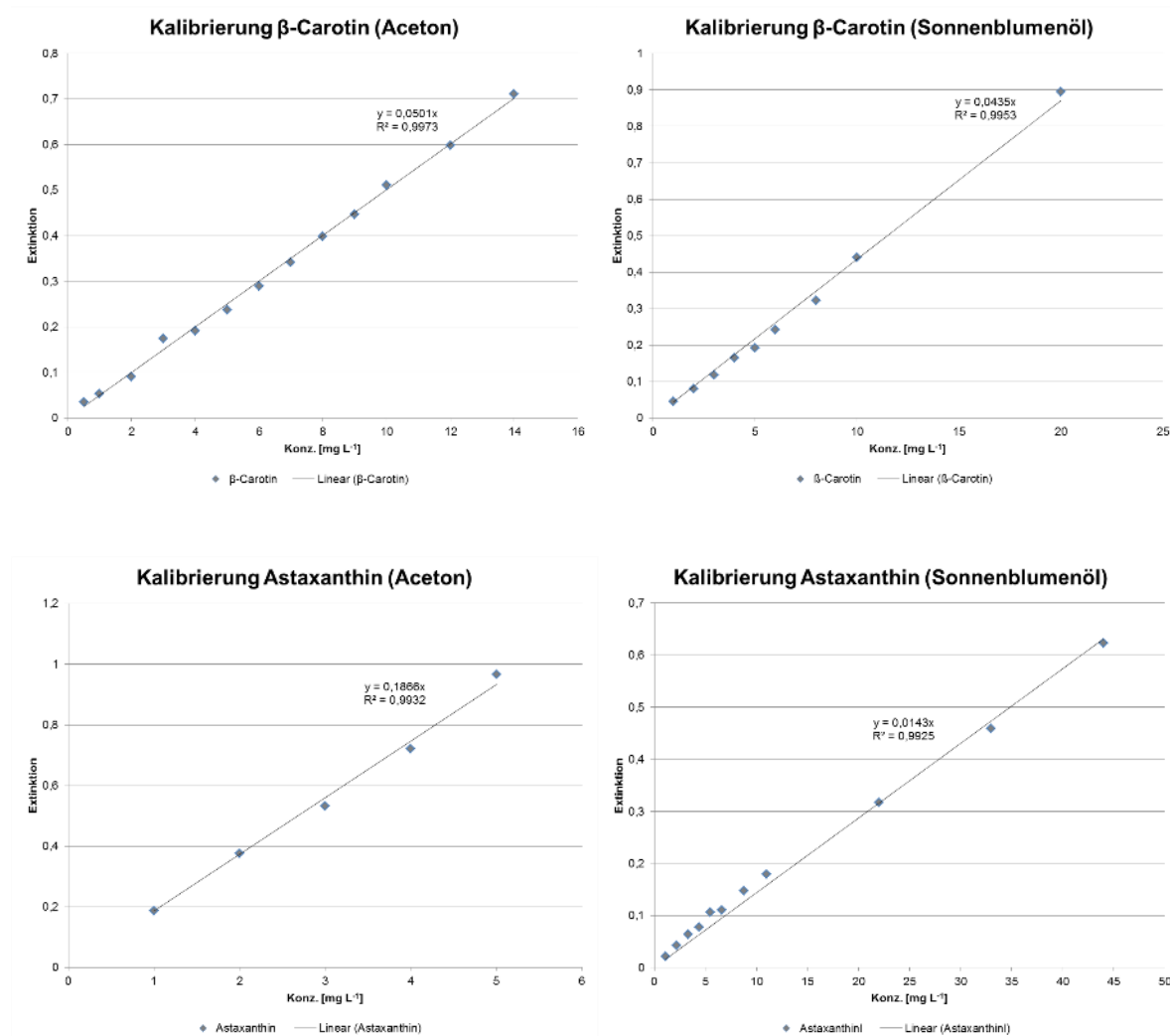
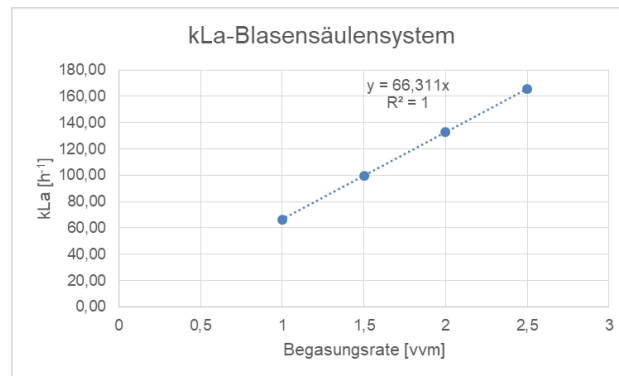


Tabelle 23. Voreingestellte Ablaufbedingungen der Gefriertrocknung

Parameter	Abs. 01	Abs. 02	Abs. 03	Abs. 04	Abs. 05	Abs. 06
Zeit [hh:mm]	-	00:10	01:00	04:00	03:00	04:00
Stellfläche [°C]	-40	-40	-40	20	20	30
Vakuum [mbar]	-	1,03	0,1	0,1	0,1	0,01

Abs. = Abschnitt

**Berechnungsgrundlage für die Ermittlung des  $k_La$  im verwendeten Blasensäulensystem.**

## Literaturverzeichnis

- (1) Yurkov, A. M.; Vustin, M. M.; Tyaglov, B. V.; Maksimova, I. A.; Sineokiy, S. P. Pigmented Basidiomycetous Yeasts Are a Promising Source of Carotenoids and Ubiquinone Q 10. *Microbiology* **2008**, *77* (1), 1–6.
- (2) Robert Koch-Institut. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **2008**, *51* (12), 1464–1482. <https://doi.org/10.1007/s00103-008-0720-5>.